

Instituto Politécnico de Coimbra



Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Departamento de Engenharia Química e Biológica

**Obtenção e identificação de grânulos de
polihidroxialcanoatos (PHA) presentes em
biomassa de um reator descontínuo
sequencial (SBR) com tratamento de águas
residuais**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de
Mestre em Processos Químicos e Biológicos

Autor

Hugo Miguel Lagarinhas Coelho de Abreu

Orientadores

Professor Doutor António Luis Pereira Amaral

Professor Doutor Luís Miguel Moura Neves de Castro

**Professora Doutora Cristina Maria Ribeiro Martins
Pereira Caridade**

Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Coimbra, dezembro de 2013

AGRADECIMENTOS

Depois de quase 2 anos, 272 dias de operação do reator, mais de 350 dias no ISEC a trabalhar experimentalmente nesta dissertação, muito suor, algum sangue e umas poucas lágrimas, termina um marcante ciclo da minha vida. Esta empreitada pessoal só foi possível com a ajuda de um determinado número de pessoas a quem muito devo. Posto isto, passo a agradecer de seguida a todas as pessoas, que de forma mais ou menos decisiva, tornaram o presente documento possível.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores desta dissertação, em especial ao Doutor Luís Miguel Moura Neves de Castro e ao Doutor António Luis Pereira Amaral, que me acompanharam mais de perto durante todo esse período, por toda a paciência e orientação tanto no trabalho laboratorial como no trabalho de redação, mas também à Doutora Cristina Maria Ribeiro Martins Pereira Caridade, pela orientação e auxílio no trabalho de redação deste Tese.

Quero agradecer a preciosa ajuda do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, na pessoa da Doutora Daniela Patrícia Bernardino Mesquita, na execução de algumas análises, que por impossibilidade técnica, não puderam ser efetuadas no ISEC.

Nos primeiros meses desta Tese, tive o prazer de receber a orientação, partilha de conhecimento e a simpatia do Engenheiro Cristiano Leal, que sempre muito amistosamente me ajudou na operação do reator e no entendimento dos conceitos inerentes à minha Tese. Penso que posso dizer que, para mim, foi o meu quarto orientador e agradeço-lhe bastante por isso.

Quero também expressar o meu agradecimento ao pessoal docente e não docente do Departamento de Engenharia Química e Biológica, nomeadamente à Doutora Maria Nazaré Coelho Marques Pinheiro e à Doutora Ana Cristina Araújo Veloso, pela cedência de alguns materiais e/ou reagentes necessários ao trabalho experimental, à Eng.^a Martine Costa, pela disponibilidade, simpatia e pela tão necessária assistência técnica, à Sra. Olinda Monteiro e à Sra. Isabel Góis, por toda a disponibilidade e simpatia, e à Eng.^a Isabel Barraca, por toda a disponibilidade e paciência demonstrada face aos constantes pedidos de reagentes. Ainda uma palavra de apreço ao Doutor Luís Jorge Assunção Martins, que, apesar do seu tempo bastante preenchido, dispôs sempre uns minutos a fim de me ceder alguma água ultrapura e de partilhar alguma da sua experiência e do seu conhecimento comigo.

Gostaria de agradecer ainda a todos os meus parceiros de laboratório e amigos que partilharam o espaço e os diversos aparelhos ao longo deste período, nomeadamente aos que mais me aturaram: à Eng.^a Brigitte Lagoa, à Eng.^a Joana Soares, à Eng.^a Irene Carvalho, à Eng.^a Helena Correia e à Eng.^a Diana Ferreira. Um agradecimento especial para o Eng.^o Carlos Gonçalo, que partilhou algumas análises de CQO comigo para as quais foi necessária uma boa dose de paciência, pela amizade e boa disposição demonstradas durante estes últimos anos. Aos meus companheiros de “sala dos PCs”, Eng.^o Héber Rebelo, Eng.^o Alexandre Oliveira, Eng.^a Alexandra Pascoal e Eng.^a Patrícia Polido, quero demonstrar o meu agradecimento pelo apoio constante ao longo dos últimos anos.

Quero deixar registada a minha enorme gratidão para com os meus Pais e para com a minha Irmã, por tantas razões que seria pouco prático estar aqui a descrever. Nunca conseguirei retribuir totalmente...

Por último, mas provavelmente o mais sentido, o meu enorme agradecimento à Eng.^a Susana Martins pela ajuda nalgumas análises mas principalmente pelo apoio, paciência, companhia e Amor incondicional demonstrados. Quero também pedir perdão por todas as intermináveis horas de espera e por todos os jantares fora de horas motivados por esta minha empreitada. Dedico-lhe a ela e à minha família todo o esforço e empenho investido nesta Tese de Mestrado.

Muito obrigado!

RESUMO

As implicações ambientais dos plásticos convencionais, produzidos através de combustíveis fósseis, não permitem a sua utilização de forma sustentável pela sociedade devido aos seus problemas de degradabilidade e à sua dependência de matérias-primas não renováveis. Surgem então os polihidroxialcanoatos (PHA) como uma alternativa ambientalmente sustentável, já que conseguem reproduzir grande parte das aplicações dos plásticos ditos normais, tendo as grandes vantagens de serem biodegradáveis e produzidos a partir de uma fonte de carbono renovável. Mais recentemente, de forma a tornar a produção do PHA mais sustentável, tem-se desenvolvido o conceito de associar a produção destes polímeros ao tratamento de efluentes líquidos através do processo de lamas ativadas. Apesar destas vantagens todo o processo que envolve a produção do PHA é ainda dispendioso.

Esta dissertação insere-se na estratégia de tentar minorar esses custos. Uma das formas de o fazer será na otimização de técnicas de quantificação do PHA em culturas mistas. Neste trabalho o principal objetivo reside na avaliação da capacidade da metodologia de análise de imagem, acoplada a microscopia de fluorescência, como método de quantificação de PHA. Pretende-se também explorar a produção de PHA a partir da simulação de um sistema de tratamento de águas residuais implementado num reator descontínuo sequencial (SBR) em regimes cíclicos de *feast/famine*, aliando assim a função de tratamento de efluentes líquidos com a produção de um produto de valor acrescentado como é o PHA.

Deste modo, foi montada uma instalação com um sistema de lamas ativadas num SBR cujo principal objetivo era produzir PHA. Este objetivo de produzir PHA através do regime de alimentação dinâmica aeróbia com uma alimentação com acetato como fonte de carbono, e sem controlo do pH foi conseguido, atingindo-se um máximo de concentração mássica de 0,37 mg PHA/mg SST e de concentração volumétrica de 1785 mg PHA/L. Em relação à capacidade de tratamento, comprovou-se a adequabilidade do sistema utilizado para a remoção da carga orgânica devido a uma elevada captação de nutrientes do afluente pela biomassa.

Foram encontradas algumas limitações na metodologia de análise de imagem ao nível da transformação da bidimensionalidade da área projetada dos grânulos de PHA nas imagens para a sua tridimensionalidade real, na gama de concentração de PHA na qual a metodologia é válida e na amostragem relativamente curta. Contudo, foi possível comprovar a potencialidade deste método obtendo-se um R^2 de 0,80 para o modelo de previsão da concentração mássica de PHA. Deste modo, pode-se concluir que esta é uma metodologia promissora para quantificar PHA em amostras de licor misto.

Palavras-chave: Lamas ativadas, polihidroxialcanoatos (PHA), reator descontínuo sequencial, regime cíclico feast/famine, análise de imagem.

ABSTRACT

The environmental implications of conventional plastics, produced through the use of fossil fuels, doesn't allow their use in a sustainable manner as a result of their low degradability and dependence of non-renewable raw materials. Polyhydroxyalkanoates (PHA) appear as an environmentally sustainable alternative, since they can reproduce most of the applications of so-called normal plastics, with the advantage of being biodegradable and produced from a renewable carbon source. More recently, and in order to allow for a more sustainable PHA production, it has arisen the concept of associating the production of these polymers with waste treatment by activated sludge processes. Although the afore mentioned advantages, the process involving PHA production is still expensive.

This thesis falls within the strategy of cost reduction. One way to do this is to optimize PHA quantification techniques on mixed cultures. In this work the main aim relies on assessing the ability of image analysis methodologies, coupled with fluorescence microscopy, as a PHA quantification method. It is also intended to explore PHA production through the simulation of a waste water treatment system implemented on a sequencing batch reactor (SBR) on cyclic feast/famine regime.

Thus, a facility was set up with an activated sludge system in a SBR whose main objective was to produce PHA. The goal of producing PHA by an aerobic dynamic feeding regime, with acetate as a carbon source, and without pH control was achieved, reaching a maximum mass concentration of 0.37 mg PHA/mg TSS and volumetric concentration of 1785 mg PHA/L. Regarding the treatment ability, the suitability of the used system for organic load removal has been proved, given the effluent high nutrient uptake by the activated sludge.

A few limitations were apparent regarding the image analysis methodology concerning the translation of the 2D dimensionality of the projected PHA granules area to their real 3D dimensionality, in the PHA concentration range in which the method is valid, and in the short sampling. However, it was possible to demonstrate the potential of this method with a R^2 of 0.80 for the PHA mass concentration prediction model. Thus, it can be concluded that this is a promising methodology for quantifying PHA in mixed liquor samples.

Keywords: Activated sludge, polyhydroxyalkanoates (PHA), sequencing batch reactor, cyclic feast/famine regime, image analysis.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	i
Resumo	v
Abstract	vii
Índice geral	ix
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xiv
Simbologia e abreviaturas	xv
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento do tema	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Estrutura da dissertação.....	2
2. Revisão bibliográfica	5
2.1. Polihidroxialcanoatos.....	5
2.1.1. Síntese de PHA	6
2.1.2. Propriedades	7
2.1.3. Grânulos de PHA.....	9
2.2. Produção de PHA: culturas puras <i>versus</i> culturas mistas	11
2.3. Produção de PHA a partir de processos de tratamento de efluentes	14
2.4. Determinação quantitativa de PHA através de análise de imagem	15
3. Secção experimental.....	17
3.1. Instalação laboratorial	17
3.2. Inóculo e alimentação.....	19
3.3. Modo de operação do reator	20
3.4. Amostragem	23
3.5. Métodos analíticos.....	25
3.5.1. Carência química de oxigénio	25
3.5.2. Carbono total	26
3.5.3. Azoto total.....	26
3.5.4. Sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis	27

3.5.5.	Índice volumétrico de lamas	29
3.5.6.	Determinação da concentração de PHA (PHB e PHV)	29
3.5.7.	Fixação das amostras para visualização ao microscópio	31
3.5.8.	Coloração <i>Nile Blue</i>	32
3.5.9.	Aquisição e análise das imagens	33
4.	Resultados e Discussão	35
4.1.	Desempenho do reator no tratamento do efluente	35
4.2.	Monitorização da produção de PHA	50
4.3.	Aquisição e análise de imagem	55
4.4.	Análise estatística multivariável	57
4.4.1.	Previsão da concentração de PHA por PLS	57
4.4.2.	Análise conjunta dos resultados por ACP e MLRA	65
5.	Conclusões	73
5.1.	Sugestões para trabalhos futuros	74
6.	Referências bibliográficas	77
7.	Anexos	83
A.	Procedimento da determinação da carência química de oxigénio	83
B.	Preparação das soluções padrão para o traçado da curva de calibração do método de determinação da concentração de PHA	84
C.	Reagentes utilizados no trabalho experimental	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos. Adaptado de (Borges, 2010).	5
Figura 2.2. Síntese e utilização de PHA. A – Reação de polimerização. B – Grânulo de PHA com as proteínas associadas. C – Formas α e β de uma cadeia de PHB. F – Estrutura polimérica semi-cristalina. E – Imagem de microscopia de força atômica (AFM) de um filme de PHBV. D – Produtos concebidos com bioplástico. Adaptado de (Laycock et al., 2013).	7
Figura 2.3. Utensílios de casa de banho fabricados em PolyOne, um composto baseado em PHBV. Retirado de (PolyOne, 2008).	8
Figura 2.4. Estrutura do monómero do (P(3HB-co-3HV)). R: metilo; R': etilo (Borges, 2010).	8
Figura 2.5. Micrografia em microscopia eletrónica de transmissão de uma secção celular da <i>Azotobacter chroococcum</i> tratada com ácido fenilacético, onde são visíveis os grânulos de PHA. Retirada de (Nutti et al., 1972).	10
Figura 2.6. Diagrama do processo de produção de PHA a partir de resíduos orgânicos. As setas com contorno sólido referem-se a fluxos de substrato enquanto as com contorno tracejado referem-se a fluxos de biomassa. Adaptado de (Dionisi et al., 2004).	15
Figura 3.1. Instalação laboratorial. 1 – Reator cilíndrico em arejamento; 2 – Dispersor de ar; 3 – Sensor de pH; 4 – Eletroválvula que permite a libertação do sobrenadante; 5 – Tubo que conduz a alimentação até ao reator; 6 – Bomba de ar; 7 – Mangueira que conduz o sobrenadante do reator até ao recipiente de recolha (não apresentado na figura); 8 – Bomba peristáltica que introduz a alimentação no reator; 9 – Alimentação.	18
Figura 3.2. Diagrama de Gantt representativo do modo de funcionamento do reator na fase A1.	21
Figura 3.3. Diagrama de Gantt representativo do modo de funcionamento do reator na fase A2.	21
Figura 3.4. Diagrama de Gantt representativo do modo de funcionamento de operação do reator na fase B1.	22
Figura 3.5. Esquema de amostragem para a primeira amostra diária, recolhida por volta das 9 horas e 25 minutos.	24
Figura 3.6. Esquema de amostragem para a segunda amostra diária, recolhida por volta das 11 horas.	24
Figura 3.7. Representação esquemática do algoritmo de análise de imagem utilizado para quantificação do PHA em amostras de licor misto. Adaptado de (Mesquita et al., 2013).	34
Figura 4.1. Evolução da temperatura do licor misto (em °C) ao longo da operação do reator.	36
Figura 4.2. Evolução da concentração de carbono total (em mg TC/L) do sobrenadante e da alimentação ao longo da operação.	38
Figura 4.3. Evolução da eficiência de remoção de carbono total (em percentagem) no sobrenadante ao longo da operação do reator.	39
Figura 4.4. Evolução da concentração de azoto total do sobrenadante e da alimentação (em mg TN/L) ao longo da operação do reator. Comparação em relação ao VLE de 15 mg TN/L, estabelecido no Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto – Anexo XVIII.	40
Figura 4.5. Evolução da eficiência de remoção de azoto total (em percentagem) no sobrenadante ao longo da operação do reator.	41

Figura 4.6. Evolução da carência química de oxigénio do sobrenadante e da alimentação (em mg O_2/L) ao longo da operação do reator. Comparação em relação ao VLE de 150 mg O_2/L , estabelecido no Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto – Anexo XVIII.	42
Figura 4.7. Evolução da eficiência de remoção de CQO (em percentagem) no sobrenadante ao longo da operação.	43
Figura 4.8. Evolução da concentração de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) (em mg SST/L ou mg SSV/L) do licor misto ao longo do tempo de operação.	44
Figura 4.9. Sólidos suspensos totais (em mg SSV/L) vs. sólidos suspensos voláteis (em mg SST/L), com regressão linear simples.	46
Figura 4.10. Evolução da carência química de oxigénio do licor misto (em mg O_2/L) ao longo da operação do reator.	47
Figura 4.11. Carência química de oxigénio do licor misto (mg O_2/L) vs. concentração de sólidos suspensos totais (mg SST/L) e sólidos suspensos voláteis (mg SSV/L), com regressão linear simples.	48
Figura 4.12. Evolução do índice volumétrico de lamas (em mL/g SST) ao longo da operação.	49
Figura 4.13. Evolução da concentração mássica de PHA (em mg PHA/mg SST) da fase <i>feast</i> e da fase <i>famine</i> ao longo da fase B2 e B3.	51
Figura 4.14. Evolução da concentração volumétrica de PHA (em mg PHA.L ⁻¹) da fase <i>famine</i> e da fase <i>feast</i> ao longo da fase B2 e B3.	53
Figura 4.15. Imagens obtidas através do procedimento de coloração de fluorescência <i>Nile Blue</i> com a ampliação de 400x. (a) Imagem original. (b) Imagem binária com identificação do PHA. (c) Imagem com identificação das inclusões de PHA evidenciada a verde.	56
Figura 4.16. Resultados do método PLS. Concentração mássica de PHA observada (em mg PHA/mg SST) vs. concentração mássica de PHA predita pelo método (em mg PHA/mg SST).	59
Figura 4.17. Resultados do método PLS. Concentração volumétrica de PHA observada (em mg PHA/L) vs. concentração volumétrica de PHA predita pelo método (em mg PHA/L).	60
Figura 4.18. Regressão linear do modelo resultante do método de previsão PLS com as concentrações mássicas de PHA, com utilização de todos valores da fase <i>famine</i> e da fase <i>feast</i> conjuntamente. Os pontos com (x) foram desprezados.	61
Figura 4.19. Regressão linear do modelo resultante do método de previsão PLS com as concentrações mássicas de PHA, com utilização de todos valores da fase <i>famine</i> e da fase <i>feast</i> conjuntamente. Os pontos com (x) foram desprezados.	61
Figura 4.20. Regressão linear do modelo resultante do método de previsão PLS com as concentrações mássicas de PHA, com utilização dos valores da fase <i>famine</i> e da fase <i>feast</i> independentemente. Os pontos com (x) foram desprezados.	62
Figura 4.21. Regressão linear do modelo resultante do método de previsão PLS com as concentrações volumétricas de PHA, com utilização dos valores da fase <i>famine</i> e da fase <i>feast</i> independentemente. Os pontos com (x) foram desprezados.	63
Figura 4.22. Previsão da concentração mássica de PHA na fase <i>famine</i> a partir do método de PLS. Comparação com os resultados experimentais observados.	64

Figura 4.23. Previsão da concentração mássica de PHA na fase <i>feast</i> a partir do método de PLS. Comparação com os resultados experimentais observados.	64
Figura 4.24. Previsão da concentração volumétrica de PHA na fase <i>famine</i> a partir do método de PLS. Comparação com os resultados experimentais observados.	65
Figura 4.25. Previsão da concentração volumétrica de PHA na fase <i>feast</i> a partir do método de PLS. Comparação com os resultados experimentais observados.	65
Figura 4.26. Regressão linear do modelo resultante do método de previsão MLRA com as médias das concentrações mássicas de PHA, da fase <i>famine</i> e da fase <i>feast</i> , e com os <i>factor scores</i> provenientes das 5 componentes da ACP. Os pontos com (×) foram desprezados.	70
Figura 4.27. Previsão da concentração média de PHA a partir da análise de regressão linear multivariada com os <i>factor scores</i> provenientes das 5 componentes da ACP. Comparação com os resultados experimentais observados.	70
Figura 4.28. Regressão linear do modelo resultante do método de previsão MLRA com as médias das concentrações mássicas de PHA, da fase <i>famine</i> e da fase <i>feast</i> , e com as variáveis mais correlacionadas com cada uma das 5 componentes da ACP. Os pontos com (×) foram desprezados.	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Conteúdo máximo atingido de PHB, em percentagem do peso seco celular, em vários estudos realizados para diversos microrganismos e fontes de carbono. Adaptado de (Qu & Liu, 2009).	12
Tabela 3.1. Composição do meio nutritivo que constitui a alimentação para 1 L de solução.	19
Tabela 3.2. Composição mássica da solução de micronutrientes para 1 L de solução.	20
Tabela 3.3. Qualidade de sedimentação das lamas em função do valor do índice volumétrico de lamas. Adaptado de (Davis, 2010).	29
Tabela 4.1. Concentração de sólidos (SST e SSV) e respetiva massa de SST descarregada dos sobrenadantes que continham perdas relevantes de biomassa durante os problemas de sedimentação.	45
Tabela 4.2. Variáveis provenientes da análise de imagem usadas no método de PLS para prever a concentração de PHA.	58
Tabela 4.3. Variáveis provenientes da análise de imagem e das determinações físico-químicas utilizadas na análise dos componentes principais.	66
Tabela 4.4. Matriz de componentes rodada (5 componentes principais). Método de extração: análise de componentes principais. Método de rotação: Varimax com normalização de Kaiser. A rotação convergiu em 6 iterações.	67
Tabela 4.5. Variáveis provenientes da análise de imagem e das determinações físico-químicas usadas no método de MLRA para prever a concentração mássica de PHA.	71
Tabela 7.1. Dados dos reagentes utilizados consoate o seu objetivo.	85

SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS

ACP	Análise dos componentes principais
ADE	Alimentação dinâmica aeróbia
AFM	<i>Atomic force microscopy</i> , microscopia de força atômica
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
CQO	Carência química de oxigênio
C/N	Razão entre carbono e azoto
EBPR	<i>Enhanced biological phosphorus removal (system)</i> , sistema biológico de remoção aumentada de fósforo
EPS	<i>Extracellular polymeric substances</i> , substâncias extracelulares poliméricas
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
F/M	<i>Food to microorganisms (ratio)</i> , razão alimento/microrganismos
IVL	Índice volumétrico de lamas
GC-FID	<i>Gas chromatograph – flame ionization detector</i> , cromatógrafo de gás com detetor de ionização de chama
HDPE	<i>High density polyethylene</i> , polietileno de elevada densidade
HPLC	<i>High performance liquid chromatograph</i> , cromatógrafo líquido de elevada eficiência
HV	Hidroxivalerato
LDPE	<i>Low density polyethylene</i> , polietileno de baixa densidade
LVs	<i>Latent variables</i> , variáveis latentes
MLRA	<i>Multiple linear regression analysis</i> , análise de regressão linear multivariada
NDIR	<i>Non-dispersive infrared</i> , infravermelho não dispersivo
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> , ressonância magnética nuclear
PAO	<i>Polyphosphate-accumulating organisms</i> , organismos acumuladores de polifosfatos
PBS	<i>Phosphate buffered saline (solution)</i> , solução salina de tampão fosfato
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Poli(3-hidroxibutirato)
PHV	Poli(3-hidroxivalerato)
PI	Padrão interno
PLS	<i>Partial least squares</i> , método dos mínimos quadrados parciais
R²	Coeficiente de determinação
RGB	<i>Red, green and blue</i> , modelo de cores composto por canais vermelho, verde e azul
SBR	<i>Sequencing batch reactor</i> , reator descontínuo sequencial

SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS

SN	Sobrenadante	
SST	Sólidos suspensos totais	
SSV	Sólidos suspensos voláteis	
ST	Sólidos totais	
TC	<i>Total carbon</i> , carbono total	
TN	<i>Total nitrogen</i> , azoto total	
VLE	Valor limite de emissão	
[PHA]	Concentração celular de polihidroxialcanoatos	em mg PHA/mg SST
[PHA]'	Concentração volumétrica de polihidroxialcanoatos	em mg PHA/L

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enquadramento do tema

Nas sociedades do início do século XXI, cresce a cada dia uma consciência ambiental cada vez maior e mais abrangente. Assim, as instituições e empresas tentam adequar e otimizar os seus produtos e processos no sentido destes serem menos prejudiciais ao meio envolvente e ambientalmente mais sustentáveis, nunca desprezando a viabilidade económica. Dessas premissas pode depender o sucesso de um produto ou de uma empresa junto do seu público. É neste contexto que surgem os polihidroxicanoatos (PHA) como uma alternativa ambientalmente mais eficiente aos plásticos de utilização quotidiana. Em termos ambientais, a principal mais-valia dos PHAs face aos plásticos convencionais é o facto de serem biodegradáveis (Johnson et al., 2009; Serafim et al., 2004; Qu & Liu, 2009; Chua et al., 2003; Coats et al., 2011).

Os PHAs, conhecidos também como bioplásticos (Johnson et al., 2009), têm outra característica que lhes confere bastante sustentabilidade. Ao contrário dos plásticos convencionais, que são produzidos a partir de derivados do petróleo, um combustível fóssil não renovável causador de grande dano ao ambiente devido à sua toxicidade e persistência no tempo, os polihidroxicanoatos são produzidos a partir de um recurso renovável. Isso acontece porque são sintetizados por microrganismos através da degradação de compostos bastante ricos em precursores de PHA e resultantes da atividade humana, açúcares e ácidos gordos (Johnson et al., 2009; Serafim et al., 2004; Qu & Liu, 2009; Chua et al., 2003; Coats et al., 2007). Tais fontes de carbono poderão provir da agricultura ou de resíduos industriais (Chua et al., 2003; Albuquerque et al., 2007), como resíduos de unidades de produção de azeite, de melação ou de papel (Johnson et al., 2009). De facto, a produção de PHA possui essa outra vantagem: pode ser concomitante aos sistemas de tratamento de efluentes como os sistemas de tratamento de águas residuais por lamas ativadas (Johnson et al., 2009; Chua et al., 2003; Coats et al., 2011; Qu & Liu, 2009). Desta forma, é possível aliar um tratamento de efluentes com a produção de um produto de valor acrescentado e de elevado valor ambiental.

Atualmente, os PHAs são produzidos e comercializados, não a partir de sistemas de tratamento por lamas ativadas, mas a partir de culturas de microrganismos puras selecionadas ou recombinantes de modo a atingir um rendimento mais elevado (Coats et al., 2007; Coats et al., 2011). Este tipo de produção de PHA não usufrui das mesmas vantagens ambientais que o referido anteriormente, uma vez que usa substratos refinados e opera em condições de assepsia (Coats et al., 2011), não podendo, por isso, ser associado a um sistema de tratamento por lamas ativadas.

Apesar de todas as vantagens dos PHAs referidas anteriormente, ainda existem alguns inconvenientes associados, nomeadamente no que toca aos seus custos de produção. Estes custos são atualmente muito superiores aos custos atribuídos aos plásticos sintéticos (Johnson et al., 2009; Qu & Liu, 2009; Serafim et al., 2004; Chua et al., 2003). Estima-se que o preço por quilograma do PHA é de 9€ enquanto que o plástico convencional custa sensivelmente 1€ por quilograma (Serafim et al., 2004). Para este elevado custo contribui o elevado preço dos substratos até hoje utilizados, o

baixo rendimento de produção de PHA e o custo do processo de extração e purificação do polímero do interior celular (Serafim et al., 2004; Lee, 1996; Reis et al., 2003).

Outro fator que incrementa o custo de produção de PHA é a morosidade e complexidade das metodologias de quantificação deste polímero. Normalmente esta quantificação é obtida através de técnicas cromatográficas como a cromatografia gasosa (GC) ou líquida de alta performance (HPLC). No entanto, estas técnicas são morosas e têm custos elevados em relação a outras técnicas de análise. Mesquita et al. (2013) provou que as técnicas de análise de imagem poderão ser uma alternativa viável na quantificação do conteúdo celular de PHA.

1.2. Objetivos

Esta tese pretende comprovar a capacidade e potencial de quantificação de PHA a partir do processamento e análise de imagens provenientes de microscopia de fluorescência, usando a metodologia de coloração *Nile Blue*, e de um modelo de previsão da concentração de PHA, baseado na metodologia dos mínimos quadrados parciais. Para isso, comparar-se-ão os resultados dessa análise com uma metodologia de quantificação convencional, a cromatografia de gás.

Outro objetivo é estudar a produção de PHA através da simulação de um sistema de tratamento por lamelas ativadas executado num reator descontínuo sequencial. Concomitantemente, pretende-se demonstrar que este tipo de sistema não é afetado na sua eficácia como sistema de tratamento de águas residuais.

1.3. Estrutura da dissertação

Esta tese de mestrado está estruturada em sete capítulos, nos quais se apresenta a revisão bibliográfica efetuada, se descreve o trabalho experimental realizado e se apresenta e discute os resultados provenientes da operação do reator e das análises efetuadas. Neste primeiro capítulo é feito um pequeno enquadramento do tema e são apresentados os objetivos propostos. O conteúdo dos capítulos seguintes é descrito de seguida.

Capítulo 2. Revisão bibliográfica. Na revisão bibliográfica é feita a apresentação e caracterização dos polihidroxialcanoatos. Começa-se por referir alguma da sua história e apresenta-se as suas metodologias de síntese. É então brevemente descrita a sua biossíntese, as suas propriedades, bem como algumas das suas vantagens, e explica-se o que são grânulos intracelulares de PHA. De seguida é feita a discussão entre as vantagens e desvantagens da produção de PHA a partir de culturas puras ou de culturas mistas. Aproveita-se este tema para introduzir a produção de PHA associada ao tratamento de efluentes. No subcapítulo seguinte, esse assunto é aprofundado. Finalmente efetua-se uma revisão bibliográfica ao tópico da determinação quantitativa de PHA através de metodologias de análise de imagem.

Capítulo 3. Secção experimental. Neste capítulo é descrita e apresentada a instalação laboratorial utilizada para a produção de PHA e tratamento do efluente, a origem do inóculo e a composição da

alimentação. O modo de operação do reator, as alterações no seu funcionamento e a estratégia de amostragem também são apresentados. No final deste capítulo são descritas todas as técnicas e metodologias analíticas utilizadas no âmbito desta tese, desde a análise à carência química de oxigênio até à determinação da concentração de PHA, passando pela determinação dos sólidos, entre outras.

Capítulo 4. Resultados e Discussão. Aqui é feita a apresentação e discussão dos principais resultados provenientes das análises realizadas. É discutido o desempenho do reator e as principais ocorrências que influenciaram o mesmo, com base nos parâmetros físico-químicos determinados. Neste capítulo também se apresentam os principais resultados da monitorização da produção de PHA no reator. No final é apresentada e discutida a análise estatística efetuada através de duas técnicas principais: análise dos componentes principais e método dos mínimos quadrados parciais multivariado.

Capítulo 5. Conclusões. Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões patentes no capítulo anterior e são dadas algumas sugestões de eventuais melhorias ou procedimentos adicionais a adotar no futuro.

Capítulo 6. Referências bibliográficas. São apresentadas as referências bibliográficas usadas para a realização deste trabalho experimental e para a redação desta dissertação.

Capítulo 7. Anexos. Apresentam-se alguns procedimentos adicionais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Polihidroxicialcanoatos

Os polihidroxialcanoatos (PHA) foram descobertos entre 1923 e 1927, quando o bacteriólogo francês Lemoigne observou inclusões no citoplasma de uma bactéria, a *Azotobacter chroococcum* (Borges, 2010; Laycock et al., 2013). Essas inclusões não eram mais do que grânulos de poli(3-hidroxi butirato) (PHB ou P(3HB)), um dos mais abundantes, e consequentemente mais estudados, polihidroxialcanoatos (Johnson et al., 2009; Serafim et al., 2004; Qu & Liu, 2009; Coats et al., 2011). Outros PHAs comuns são o poli(3-hidroxivalerato) (PHV), o poli(3-hidroxihexanoato) (PHHx) (Serafim et al., 2004) e o poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV)) (Laycock et al., 2013). Em 1959, a empresa *W. R. Grace & Co* patenteou um processo de produção de PHB através de bactérias (Baptist & Ziegler, 1965) apesar das suas limitações ao nível da eficiência de produção, da estabilidade térmica e das tecnologias de extração (Laycock et al., 2013). Em 1970, a *Imperial Chemical Industries Ltd.* comercializou efetivamente o P(3HB-co-3HV) sob o nome comercial de Biopol™ (Holmes, 1985). Desde aí, a tecnologia foi vendida à *Monsanto*, em 1998, e depois à *Metabolix*, em 2001. Recentemente, no âmbito na produção de PHA através de culturas puras de microrganismos, tem-se apostado na síntese de copolímeros alternativos como o poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxihexanoato) (P(3HB-co-3HHx)) sob o nome comercial de Nodax™ (Noda et al., 2005).

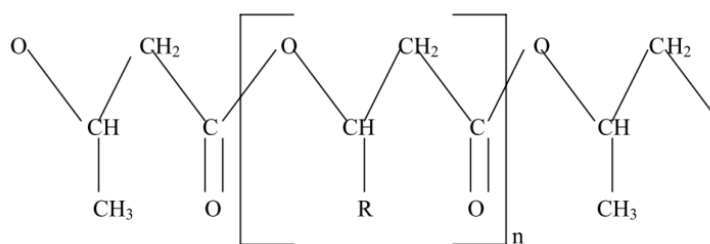


Figura 2.1. Estrutura geral dos polihidroxicanoatos. Adaptado de (Borges, 2010).

Os PHAs (cuja estrutura geral é apresentada na Figura 2.1) são poliésteres de hidroxialcanoatos sintetizados por diversos microrganismos, principalmente bactérias, como forma de acumular reservas de energia e carbono intracelular no seu citoplasma, quando em condições de excesso da fonte de carbono (Johnson et al., 2009; Qu & Liu, 2009; Changli et al., 2010; Chua & Yu, 1999; Lee, 1996; Coats et al., 2011). Algumas bactérias podem acumular de 70% a 90% do seu peso seco em PHA (Johnson et al., 2009; Laycock et al., 2013). Estas elevadas concentrações são permitidas devido ao PHA não alterar substancialmente o estado osmótico do citoplasma (Anderson & Dawes, 1990). Não só bactérias produzem PHA, aliás, até 2003, tinham sido descobertos mais de 300 tipos de microrganismos com a capacidade de sintetizar este polímero (Chua et al., 2003; Coats et al., 2011). Alguns exemplos desses microrganismos são o *Ralstonia eutropha*, o *Alcaligenes latus*, o *Azotobacter vinelandii*, a *Escherichia coli* recombinante e várias estirpes de metilotróficos. Estes microrganismos têm sido intensivamente estudados devido à sua elevada produtividade em PHA (Lee, 1996).

2.1.1. Síntese de PHA

Ao nível molecular, a biossíntese de PHA pode ser descrita em quatro vias metabólicas principais. A primeira foi bastante estudada no organismo modelo *Ralstonia eutropha* e envolve as enzimas β -cetotiolase, a redutase acetoacetyl-CoA dependente do NADPH e a PHA sintase (Doi, 1990; Anderson & Dawes, 1990; Laycock et al., 2013). A fonte de carbono é inicialmente convertida em tioésteres da coenzima A do ácido (R)-hidroxialcanóico. Ocorre então a condensação de dois monómeros de tioésteres da coenzima A, como uma molécula de acetyl-CoA e outra de propionil-CoA, consoante a fonte de carbono presente, através da catálise da β -cetotiolase. Segue-se uma redução da qual resulta a (R)-3-hidroxiacetyl-CoA (ou (R)-3-hidroxiacetyl-CoA), catalisada pela redutase acetoacetyl-CoA, que é convertida em PHA através da ação da PHA sintase (Lawrence et al., 2005). Na reação de despolimerização o PHA acumulado é hidrolisado em 3-hidroxiacetylato pela despolimerase e convertido de novo em acetoacetyl-CoA.

A segunda via metabólica está associada à captação de ácidos gordos por parte de microrganismos. Esses ácidos gordos são β -oxidados em acil-CoA e o precursor é então convertido em 3-hidroxiacil-CoA que pode resultar em PHA através da atividade catalítica da sintase. Nesta reação estão envolvidas as enzimas redutase 3-cetoacil-CoA, uma epimerase e a (R)-enoyl-CoA hidratase. Pensa-se que a oxidase acil-CoA e a enoyl-CoA hidratase também estão envolvidas (Laycock et al., 2013).

A terceira via metabólica não é mais que a conversão dos substratos em 3-hidroxiacetyl-ACP do qual depois pode resultar a 3-hidroxiacetyl-CoA e consequentemente PHA. Este caminho é realizado por ação da transferase 3-hidroxiacetyl-ACP-CoA e pela malonil-CoA-ACP transilase (Laycock et al., 2013).

A quarta via metabólica envolve a oxidação da (S)-(+)-3-hidroxiacetyl-CoA através da redutase acetoacetyl-CoA dependente do NADPH. Existem outras vias metabólicas que estão associadas à síntese de outros copolímeros. Por exemplo, a quinta e a sétima vias metabólicas estão referenciadas na síntese do poli(4-hidroxiacetylato) (Laycock et al., 2013).

A regulação do metabolismo do PHA pode ocorrer a diferentes níveis: na ativação da expressão génica devido a condições externas específicas, como a falta de algum nutriente; na regulação das enzimas que sintetizam o PHA por parte de metabolitos ou determinados componentes celulares; na inibição por parte de enzimas provenientes de vias metabólicas competidoras, o que resulta no aumento dos metabolitos intermédios necessários à síntese do PHA; ou na combinação dos anteriores (Kessler & Witholt, 1998).

Na Figura 2.2 está representada uma visão global e simplificada da síntese dos polihidroxiacanoatos, que vai da sua polimerização catalisada por enzimas até ao fabrico de utensílios formados a partir de PHA.

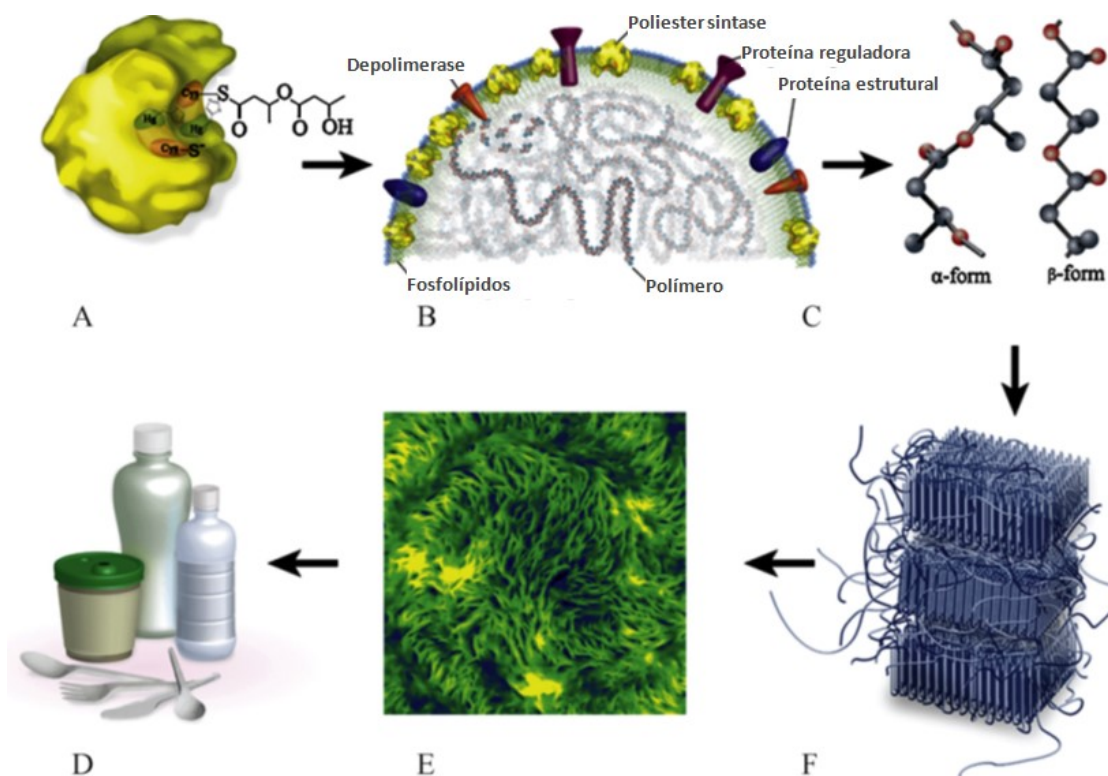


Figura 2.2. Síntese e utilização de PHA. A – Reação de polimerização. B – Grânulo de PHA com as proteínas associadas. C – Formas α e β de uma cadeia de PHB. F – Estrutura polimérica semi-cristalina. E – Imagem de microscopia de força atômica (AFM) de um filme de PHBV. D – Produtos concebidos com bioplástico. Adaptado de (Laycock et al., 2013).

2.1.2. Propriedades

Os PHAs têm propriedades mecânicas semelhantes às do polipropileno e polietileno (Qu & Liu, 2009; Mesquita et al., 2013), nomeadamente no que toca à temperatura de fusão e à sua elevada cristalinidade, que pode ir dos 55% aos 80% (Coats et al., 2007; Coats et al., 2011; Laycock et al., 2013; Reis et al., 2003). Outras propriedades mecânicas interessantes dos PHAs é o facto de serem termoplásticos (Serafim et al., 2004; Coats et al., 2011) e terem propriedades elastómeras (Johnson et al., 2009; Laycock et al., 2013). No entanto, a sua característica mais interessante e mais diferenciadora enquanto polímero é a sua completa biodegradabilidade. Por serem um produto proveniente do metabolismo celular, as bactérias têm grande facilidade em degradá-lo em compostos mais simples. Estes polímeros são também piezoelétricos, opticamente ativos (Holmes, 1985), hidrofóbicos e insolúveis em água (Laycock et al., 2013). Os PHAs são menos passíveis de serem degradados pelos raios UV do que o polipropileno ainda que tenham menor resistência a solventes (Laycock et al., 2013). Além disso podem ser usados na indústria alimentar e biomédica uma vez que são não tóxicos e são biocompatíveis (Johnson et al., 2009; Borges, 2010; Coats et al., 2011). Mais especificamente, estes poliésteres podem ser usados como fonte de centros quirais para a síntese de alguns antibióticos, no sistema de libertação controlada de fármacos ou em aplicações na reposição de osso (Brandl et al., 1990; Doi, 1990). As suas aplicações também se estendem à utilização no fabrico de utensílios (ver Figura 2.3) e películas biodegradáveis (Coats et al., 2011). Na sua forma

menos refinada, os PHAs poderão ser potencialmente incorporados na produção de compósitos de fibra de madeira e termoplásticos.

Apesar das suas já favoráveis propriedades, é ainda possível melhorar as suas capacidades poliméricas através de uma reação de copolimerização do PHB com o PHV. Esta reação resulta num composto de melhorada ductilidade, resistência ao impacto e flexibilidade, e diminui a sua temperatura de fusão e de transição vítrea (Coats et al., 2007; Coats et al., 2011; Borges, 2010; Laycock et al., 2013) sem afetar a temperatura de degradação, o que permite melhores condições de processamento (Reis et al., 2003). Aliás, o tipo de monómeros presentes na estrutura do polímero é um dos fatores com relevância nas propriedades finais do PHA. Por exemplo, o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV)), um copolímero constituído pelo monómero apresentado na Figura 2.4, dependendo do seu conteúdo em hidroxivalerato (HV), pode ter propriedades diferentes. Com 10% de HV, as propriedades do P(3HB-co-3HV) assemelham-se às do polietileno de elevada densidade (HDPE). Já se essa percentagem atingir os 20%, o copolímero tende a aproximar-se do polietileno de baixa densidade (LDPE).

Outras metodologias para aperfeiçoar as capacidades mecânicas dos PHAs são a adição de aditivos ou a mistura com outros materiais poliméricos. Esta última melhoria pode até aumentar a eficiência económica do processo de produção e é relativamente fácil de adotar (Laycock et al., 2013).

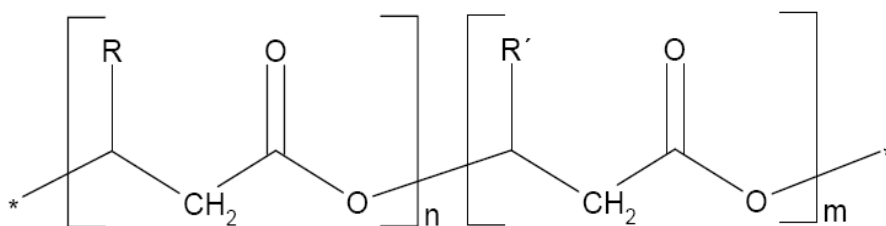


Figura 2.4. Estrutura do monómero do (P(3HB-co-3HV)). R: metilo; R': etilo (Borges, 2010).

A distribuição do peso molecular é também responsável por algumas das propriedades finais do PHA (Laycock et al., 2013; Reis et al., 2003). As propriedades mecânicas degradam-se quando o peso molecular médio é inferior a $0,4 \times 10^6$ Da (Cox, 1995) e em aplicações termoplásticas esse valor deverá ser superior a $\sim 0,6 \times 10^6$ Da (Luzier, 1992). Este parâmetro poderá ser controlado já que é sabido que diferentes bactérias sintetizam polímeros P(3HB) de diferentes pesos moleculares (Dionisi et al., 2005) e que o PHA produzido por microrganismos tem um peso molecular muito mais elevado que o PHA sintetizado quimicamente (Chen, 2010).



Figura 2.3. Utensílios de casa de banho fabricados em PolyOne, um composto baseado em PHBV. Retirado de (PolyOne, 2008).

Na estimulação da produção de PHA, a escolha da composição da alimentação fornecida às culturas mistas tem consequências na composição do PHA acumulado pelos microrganismos (Laycock et al., 2013; Dionisi et al., 2004; Oehmen et al., 2007). Por exemplo, há registros que diferentes razões entre as concentrações de acetato e propionato na alimentação inferem na quantidade de monômero hidroxivalerato no copolímero P(3HB-co-3HV), podendo ir dos 17% aos 85% em percentagem molar (Lemos et al., 2006; Takabatake et al., 2000). Já as culturas puras precisam de grandes quantidades de outros substratos, em conjunto com a principal fonte de carbono, para produzirem pequenas frações de monômeros que não o principal. Isto poderá dever-se à diversidade de microrganismos existentes nas culturas mistas (Laycock et al., 2013). Os ácidos gordos voláteis, como os acetatos, os propionatos ou os butiratos, são as fontes de carbono mais comumente utilizadas quando se pretende produzir PHA uma vez que são rapidamente armazenados como polímeros de reserva por partes das culturas mistas (Laycock et al., 2013).

Mesmo dentro das culturas mistas, diferentes composições da população microbiana podem ter influência direta na composição de PHA armazenado. É o caso dos organismos acumuladores de polifosfatos (PAOs), usados nos sistemas biológicos de remoção aumentada de fósforo (EBPR). Se a alimentação for constituída por propionato, os PAOs armazenam muito pouco PHB e uma grande percentagem de poli- β -hidroxi-2-metilvalerato (PH2MV, um isómero do PHV), dado que o propionil-CoA, produto da metabolização do propionato, condensa seletivamente formando PH2MV. Essa condensação pode ainda ser aleatória, resultando na produção de uma grande fração de PH2MV e PHB e numa menor quantidade de PHV (Oehmen et al., 2007).

2.1.3. Grânulos de PHA

No interior no citoplasma celular, os polihidroxialcanoatos são sintetizados sob a forma de inclusões insolúveis denominadas grânulos de PHA, visíveis na Figura 2.5. Estes grânulos foram observados pela primeira vez por Beijerinck em 1888 (Laycock et al., 2013). Esta estrutura tem um núcleo amorfo constituído por poliésteres de hidroxialcanoatos (PHA). Com a utilização de um microscópio eletrónico, é possível observar à superfície dos grânulos uma fina monocamada, que poderá ir dos 3 nm aos 14 nm de espessura, constituída por fosfolípidos e com proteínas incorporadas (Grage et al., 2009; Jendrossek et al., 2007; Mayer & Hoppert, 1997), como está representado na Figura 2.2 – B.



Figura 2.5. Micrografia em microscopia eletrônica de transmissão de uma secção celular da *Azotobacter chroococcum* tratada com ácido fenilacético, onde são visíveis os grânulos de PHA. Retirada de (Nuti et al., 1972).

Uma das mais abundantes proteínas na superfície dos grânulos é a proteína PhaP, que pode cobrir entre 14% e 54 % da superfície do grânulo (Neumann et al., 2001; Tian et al., 2005). Esta proteína tem uma função regulatória, sendo a sua expressão induzida pelos níveis de acumulação de PHA (Tian et al., 2005). Têm a capacidade de controlar a quantidade (York et al., 2001), o tamanho e até o número de grânulos de tal forma que, na ausência destas proteínas, o PHA é acumulado sob a forma de um único grânulo de grandes dimensões (Wieczorek et al., 1995). Pelo contrário, caso a concentração da proteína PhaP seja elevada, resultará daí a formação de um maior número de grânulos de menor volume (Potter et al., 2002). Esta capacidade de regulação é fornecida pelas suas propriedades químicas. As proteínas PhaP são anfifílicas, sendo que a sua parte hidrofóbica encontra-se em contacto com o PHA, enquanto a sua parte hidrofílica é exposta ao citoplasma (Potter & Steinbuchel, 2005). Quando as condições para a acumulação de polihidroxialcanoatos não são as melhores, as proteínas PhaP ligam-se às PHA sintases, outra das proteínas que constitui a superfície dos grânulos. Chegando ao máximo de conteúdo celular de PHA (90% do peso seco celular), mostrou-se que a concentração de PHA sintases continua elevada, pelo que é provável que o constrangimento físico seja também um dos fatores que condicionam a acumulação deste polímero (McCool et al., 1996).

2.2. Produção de PHA: culturas puras *versus* culturas mistas

A produção biológica de PHA pode ser efetuada através de dois tipos de biomassa: culturas puras ou culturas mistas de microrganismos. A produção através de culturas puras compreende dois processos descontínuos de produção. No primeiro é introduzido um inóculo de uma estirpe de um microrganismo, normalmente uma bactéria, numa solução estéril composta por uma fonte de carbono adequada e por outros macronutrientes e micronutrientes metálicos. Numa segunda etapa, um dos macronutrientes essenciais, como o azoto, o fósforo ou o oxigénio, é propositadamente limitado, o que estimula a acumulação de polímeros de reserva como o PHA. As propriedades do polímero produzido irão depender da composição da fonte de carbono proveniente da alimentação durante a acumulação, das vias metabólicas utilizadas pela bactéria na conversão e das especificações do substrato em relação às enzimas envolvidas (Byrom, 1994).

A produção de PHA por culturas mistas tem atraído muita atenção devido às suas vantagens face às culturas puras. A produção de PHA a partir de culturas puras, baseadas apenas numa estirpe de microrganismo, é, em regra, muito cara uma vez que têm que se assegurar determinados requisitos para o bom funcionamento do processo. Para a síntese de compostos de acumulação de carbono, as culturas puras necessitam de alimentações bem definidas e de rigorosas condições de assepsia (Johnson et al., 2009; Qu & Liu, 2009; Coats et al., 2007). É fundamental que não haja contaminações do meio fermentativo que ponham em causa o processo produtivo. Para assegurar tais condições são exigidas elevadas quantidades de substrato altamente refinado, equipamento que assegure as condições de assepsia (por norma equipamento dispendioso) e elevado consumo de energia para assegurar as condições ótimas de temperatura para um microrganismo específico (Qu & Liu, 2009). Como se pode verificar na Tabela 2.1, os substratos utilizados para culturas puras são essencialmente açúcares (glucose e sucrose) e ácidos gordos, com um processo de refinamento de custo elevado. Em relação à fonte de carbono existe ainda outra condicionante, derivada do facto de atualmente estarem a ser usadas, para produção e posterior comercialização de PHA, correntes de alimentação baseadas em substratos refinados provenientes de produtos agrícolas (Coats et al., 2011). O milho e o óleo de soja (Tabela 2.1) são dois exemplos que motivam preocupações semelhantes ao uso de produtos alimentares para produção de biocombustíveis. O uso de colheitas de produtos essenciais para a alimentação humana na produção de bioplásticos resulta em problemas a longo prazo, já que aumenta o valor desses produtos nos mercados e direciona a produção para outras indústrias que não a alimentar. Todos estes fatores fazem com que a produção em larga escala de PHAs a partir destas culturas seja economicamente inviável, principalmente face aos custos de produção dos plásticos convencionais.

Tabela 2.1. Conteúdo máximo atingido de PHB, em percentagem do peso seco celular, em vários estudos realizados para diversos microrganismos e fontes de carbono. Adaptado de (Qu & Liu, 2009).

Cultura de microrganismos	Fonte de carbono	Processo	PHA ou PHB (%)	Referência
<i>A. latus</i>	Sucrose	Limitação de azoto	50	(Yamane et al., 1996)
<i>A. eutrophus</i>	Glucose	Limitação de fósforo	82	(Ryu et al., 1997)
<i>R. eutropha</i>	Ácidos gordos voláteis	Limitação de azoto	60	(Du & Yu, 2002)
<i>R. eutropha</i> recombinante	Óleo de soja	Sem limitação	57	(Taguchi et al., 2003)
<i>E. coli</i> recombinante	Glucose	Sem limitação	77	(Wang & Lee, 1997)
Lamas ativadas	Acetato	Limitação de azoto	78	(Lemos et al., 2006)
Lamas ativadas	Acetato	Limitação de azoto	89	(Johnson et al., 2009)
Lamas ativadas	Acetato	Limitação de acetato	68	(Serafim et al., 2004)
Lamas ativadas	Acetato	Alimentação em 3 pulsos, limitação de azoto	79	
Lamas ativadas	Acetato	Sem limitação	64	(Qu & Liu, 2009)
Lamas ativadas	Acetato	Limitação de oxigénio	62	(Sato et al., 1998)
Lamas ativadas	Ácidos gordos voláteis	Sem limitação	50	(Dionisi et al., 2004)
Lamas ativadas	Águas residuais enriquecidas com acetato	Sem limitação	30	(Chua & Yu, 1999)
Lamas ativadas	Águas residuais da indústria do papel enriquecidas com metanol	Limitação de vários nutrientes	85	
Lamas ativadas	Águas residuais provenientes de tratamento primário	Limitação de vários nutrientes	53	(Coats et al., 2007)
Lamas ativadas	Águas residuais da indústria do biodiesel	Limitação de vários nutrientes	10	
Lamas ativadas	Melaço previamente fermentado	Alimentação em pulsos, sem limitação	58	(Oehmen et al., 2014)
Lamas ativadas (PAOs)	Acetato	Sem limitação	87	(Carvalho et al., 2007)
Lamas ativadas (PAOs ou GAOs)	Acetato	Sem limitação	55*	(Oehmen et al., 2005a)

*percentagem de PH2MV.

Dentro das culturas puras destacam-se ainda as culturas com microrganismos geneticamente modificados. Este tipo de microrganismos tem rendimentos de produção elevados, superiores aos das estirpes selvagens. Algumas bactérias recombinantes, por exemplo de *E. coli*, conseguem produzir cerca de 100 g/L de PHA em 40 horas (Johnson et al., 2009). No entanto, este tipo de microrganismos, até prova em contrário, tem as mesmas limitações que as culturas puras, com o

inconveniente adicional da necessidade de haver um grande investimento em investigação e desenvolvimento para o processo ser otimizado.

A síntese de polihidroxialcanoatos por culturas mistas foi observada pela primeira vez numa unidade de tratamento águas residuais em 1974 quando se detetaram heteropolímeros de PHA em extratos de clorofórmio provenientes de lamas ativadas (Laycock et al., 2013). As culturas mistas, constituídas por uma variedade não controlada de microrganismos (como bactérias, fungos, protozoários, etc.), parecem ser a alternativa de futuro no que toca à produção de PHA. Ao contrário das culturas puras, as culturas mistas não necessitam de rigorosas condições de assepsia e os substratos utilizados podem ser menos refinados que os ácidos gordos voláteis sintéticos, englobando resíduos orgânicos, e sendo portanto menos dispendiosos ou até gratuitos (Qu & Liu, 2009; Coats et al., 2011; Laycock et al., 2013; Reis et al., 2003). Aliás tem sido bastante estudada a aplicação da produção de PHA ao processo de tratamento de águas residuais por lamas ativadas (Qu & Liu, 2009; Satoh et al., 1998), até porque muitas das correntes com águas residuais são ricas em precursores de PHA, como acetatos, azoto e fósforo (Coats et al., 2011). A ideia de produzir PHA através de lamas ativadas surgiu em resultado de o PHA ser um produto metabólico intermédio nesse processo. De facto, os polihidroxialcanoatos são um dos mais importantes componentes de armazenamento de carbono, especialmente no processo aeróbio por lamas ativadas (Chua et al., 2003; Tchobanoglous et al., 2003). Existe também, neste momento, um vasto conhecimento e abrangência de aplicação destas culturas mistas já que têm sido aplicadas, para além do tratamento de efluentes, na produção de bioenergia e na biometalurgia.

Em relação ao rendimento de produção, no início, quando se implementou o processo de lamas ativadas à produção de PHA, verificou-se que a capacidade de produção e armazenamento do PHA era inferior à das culturas puras (Reis et al., 2003). No entanto, esse hiato entre os dois processos começa a desaparecer, com alguns estudos recentes que dão um conteúdo celular em PHB de 89% em peso seco (ver Tabela 2.1). Apesar da diferença de rendimento, existem já alguns estudos que confirmam a viabilidade económica do processo de produção de PHA por culturas mistas, aliado ao tratamento de águas residuais, face ao processo de produção por culturas puras (Gurieff & Lant, 2007). Este artigo refere inclusivamente que existem vantagens económicas no processo de produção de PHA por culturas mistas relativamente à produção de biogás (por metanogénese anaeróbia) para o tratamento de um mesmo efluente. Outro estudo de projeto e de avaliação económica (Meeters, 1998) mostrou que é possível reduzir o custo dos PHA para 4€/kg através da produção de PHB e PHV a partir de resíduos orgânicos. Apesar de todas estas vantagens, ainda existem dúvidas quanto à competitividade económica dos PHAs em relação aos plásticos convencionais. Deste modo, torna-se necessário otimizar o processo com uma dada fonte de carbono para que se torne economicamente viável.

Existem ainda outros métodos de produção de polihidroxialcanoatos que não através do metabolismo quimioorganoheterotrófico de culturas de microrganismos. Em 1992, demonstrou-se que era viável a produção deste polímero através de um sistema autotrófico baseado em plantas geneticamente modificadas (Poirier et al., 1992). Usando uma planta geneticamente modificada do género *Arabidopsis*, foi possível obter a expressão da redutase da acetoacetil-CoA e

consequentemente a síntese de PHA pela bactéria *Ralstonia eutropha*. Este mecanismo também tem sido desenvolvido noutras plantas geneticamente modificadas, como a planta do tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Bohmert-Tatarev et al., 2011), a erva *Panicum virgatum* (Somleva et al., 2008) ou em microalgas (Hempel et al., 2011). Quimicamente, também é possível sintetizar PHA através propiolactonas usando, por exemplo, catalisadores de alumínio ou de zinco com a água como co-catalisador. No entanto, este processo não é economicamente viável em produção de larga escala e envolve o uso de reagentes tóxicos (Laycock et al., 2013).

2.3. Produção de PHA a partir de processos de tratamento de efluentes

A produção de PHA combinada com um processo de tratamento de efluentes ganha uma nova dimensão pelo facto de se poder aliar um dever social e ambiental necessário para reduzir a pegada ecológica antropogénica à produção de um produto de valor acrescentado. É neste contexto que foi proposto (Majone et al., 1999) um processo produção de polihidroxialcanoatos a partir de resíduos orgânicos que envolve três fases, uma anaeróbica e as outras aeróbicas (Figura 2.6). A primeira etapa (anaeróbica) passa por uma fermentação acidogénica, que tem o objetivo de converter um resíduo biodegradável numa mistura constituída por acetatos e outros ácidos gordos voláteis. Estes compostos, utilizados como alimentação, mostraram ser adequados para o armazenamento de PHA em culturas mistas (Dionisi et al., 2004; Johnson et al., 2009; Serafim et al., 2004). Na segunda fase, o processo em aerobiose é operado com uma carga orgânica média a elevada através de uma alimentação faseada, num reator sequencial descontínuo (SBR). O objetivo é proporcionar as condições para o crescimento de biomassa com capacidade de armazenar PHA. Nesta segunda fase, este tipo de condições propicia uma das metodologias de alimentação ao reator mais utilizadas para promover a produção de PHA, a alimentação dinâmica aeróbia (ADE). A cultura de microrganismos é submetida a vários ciclos aeróbios *feast/famine* (abundância/esgotamento), que consequentemente induz uma pressão ecológica seletiva favorecendo organismos com elevada capacidade de armazenar PHA (Laycock et al., 2013; Dionisi et al., 2004). No estágio *feast* (que se traduz por abundância), o meio de crescimento é bastante rico em carbono, o que leva os microrganismos a acumular reservas sob a forma de inclusões poliméricas. Já durante a fase *famine* (que se traduz por esgotamento ou escassez), o carbono existente esgota-se e apenas a comunidade microbiana que acumulou polímeros de reserva consegue continuar a crescer. A terceira e última etapa do processo de produção de PHA envolve um considerável aumento da carga orgânica com o objetivo de maximizar o conteúdo de PHA. Por fim, as lamas ricas em polihidroxialcanoatos seguem para um processo de extração e purificação a jusante com o objetivo de isolar o bioplástico.

Outro método de produção de PHA, a partir de culturas mistas, utiliza uma abordagem semelhante ao processo de produção de PHA com culturas puras (Punrattanasin, 2001). Este processo consiste numa fase de crescimento da biomassa seguida de um período de limitação de um outro macronutriente que não o carbono, como, o azoto e/ou o fósforo. Vários estudos (Punrattanasin, 2001; Coats et al., 2007) conseguiram, a partir deste método, produzir PHA com sucesso.

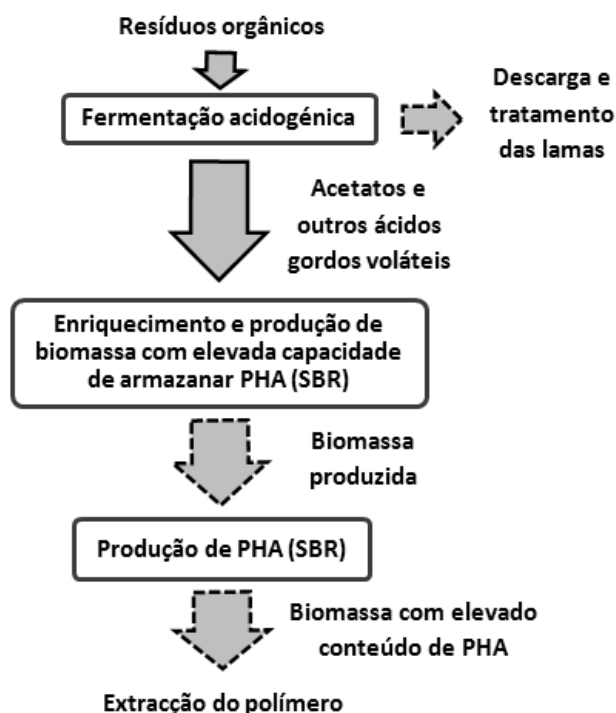


Figura 2.6. Diagrama do processo de produção de PHA a partir de resíduos orgânicos. As setas com contorno sólido referem-se a fluxos de substrato enquanto as com contorno tracejado referem-se a fluxos de biomassa. Adaptado de (Dionisi et al., 2004).

2.4. Determinação quantitativa de PHA através de análise de imagem

Até à data de realização desta tese, poucos trabalhos publicados exploraram técnicas de análise de imagem com o objetivo de prever ou determinar a concentração de PHA em culturas mistas. Existem algumas publicações que utilizam tais técnicas para efetuar determinações qualitativas (Ostle & Holt, 1982; Johnson et al., 2009; Carvalho et al., 2007) ou para estudar aspetos da morfologia da biomassa no licor misto (Jenné et al., 2007; Da Motta et al., 2001; Amaral et al., 2013), mas são poucas as que se focam na determinação quantitativa deste polímero de reserva no conteúdo celular. Uma das técnicas comuns, não só de quantificação do PHA, mas também da identificação dos seus constituintes e respetivas estruturas químicas, é a ressonância magnética nuclear (NMR) (Oehmen et al., 2005b). Porém, o principal método de determinação quantitativa dos polihidroxialcanoatos, devido à sua maior exatidão face à NMR (Oehmen et al., 2005b), quer em culturas mistas quer em culturas puras, parecem ser, quase exclusivamente, as técnicas cromatográficas, nomeadamente a cromatografia de gás-líquido (GLC) (Chua et al., 2003; Coats et al., 2011; Dionisi et al., 2004; Johnson et al., 2009; Lemos et al., 2006; Qu & Liu, 2009; Ryu et al., 1997; Serafim et al., 2004; Wang & Lee, 1997; Yamane et al., 1996). Esta técnica analítica, apesar de muito fiável e rigorosa, é bastante morosa e dispendiosa, para além de não poder ser implementada na linha de produção (*on-line*) (Mesquita et al., 2013). Estes fatores contribuem para que a sua aplicação massificada seja inviável ao nível industrial. Assim, torna-se necessário o estudo e desenvolvimento de outras técnicas

mais expeditas, económicas e não invasivas, sem ceder demasiado no rigor e na qualidade dos resultados experimentais.

É neste contexto que surge a ideia de aplicar metodologias de análise de imagem acopladas a técnicas de microscopia para determinar a concentração de PHA no conteúdo celular numa dada amostra de licor misto. Neste sentido duas possibilidades distintas poderiam ser abordadas, nomeadamente a utilização de colorações clássicas em microscopia de campo claro ou a utilização de fluorocromos em microscopia de fluorescência. Esta última possui a vantagem de, teoricamente, se poder obter imagens com menor interferência dos agregados microbianos na visualização dos grânulos de PHA. Assim, esta análise incidiu na utilização de uma metodologia de coloração com o fluorocromo *Nile Blue* para a visualização de grânulos de PHA, que fluorescem a um comprimento de onda compreendido entre 625 nm a 675 nm, correspondente ao espectro de cor vermelha (Mesquita et al., 2013). Para a correta determinação da concentração de PHA foi efetuada a assunção de que, dentro de certos limites, a intensidade de fluorescência aumenta diretamente com a concentração de polímero presente na amostra (Ostle & Holt, 1982).

Mesquita et al. (2013) mostrou que a utilização de técnicas de análise de imagem, acopladas a microscopia de fluorescência e coloração *Nile Blue*, é uma técnica promissora. A metodologia utilizada baseou-se na identificação e quantificação dos grânulos de PHA, pela obtenção das suas áreas projetadas e intensidades de fluorescência. Posteriormente os dados obtidos por esta metodologia foram processados por técnicas de estatística multivariável de modo a prever a concentração do PHA intracelular. Assim, foi utilizado o método dos mínimos quadrados parciais, tendo sido obtidos coeficientes de correlação máximos de 0,64, 0,42 e 0,65 entre os valores preditos e observados para a concentração de PHB, PHV e PHA, respetivamente. Estes coeficientes de correlação foram determinados analisando os valores obtidos a partir das amostras retiradas quer na fase aeróbica quer na anaeróbica (Mesquita et al., 2013). Apesar dos coeficientes de correlação serem pouco satisfatórios, refira-se ser este apenas o primeiro trabalho do género e os autores apontarem algumas modificações para melhorar a robustez e a capacidade de previsão do método de análise, nomeadamente otimizando a metodologia de coloração e trabalhando com uma base de dados mais ampla (Mesquita et al., 2013).

3. SECÇÃO EXPERIMENTAL

3.1. Instalação laboratorial

A instalação laboratorial utilizada para produzir polihidroxialcanoatos baseia-se num reator sequencial por partidas (SBR – *sequencing batch reactor*) contendo uma suspensão celular. O reator utilizado (Figura 3.1 - 1) é uma estrutura cilíndrica de 17 cm de diâmetro construída em acrílico com um volume de cerca de 6 L. No presente trabalho experimental o volume útil foi normalmente de 3,8 L. Este reator está equipado com uma camisa de aquecimento e com um sistema de borbulhamento ligado a uma bomba de vácuo (*VWR International, LLC, E.U.A.*) (Figura 3.1 - 6), que permite o arejamento forçado e a mistura da suspensão. Uma solução de nutrientes foi alimentada ao reator (Figura 3.1 - 9) por meio de uma bomba peristáltica (modelo *Minipuls Evolution, Gilson, Inc., E.U.A.*) (Figura 3.1 - 8). No final da fase de sedimentação, o sobrenadante resultante de cada ciclo é descarregado por gravidade através de uma electroválvula (*Bürkert Fluid Control Systems, Alemanha*) (Figura 3.1 - 4) sendo recolhido para posterior análise. A medição do pH do licor misto é feita através de uma sonda de pH (modelo *Blueline 18 pH, Schott, Alemanha*) (Figura 3.1 - 3). A temperatura foi medida com um termómetro de mercúrio. As amostras do reator foram retiradas com o auxílio de uma seringa com 100 mL de capacidade. Um conjunto de temporizadores permitia controlar o ciclo de funcionamento do SBR, atuando sobre as bombas de arejamento e de alimentação e a eletroválvula.

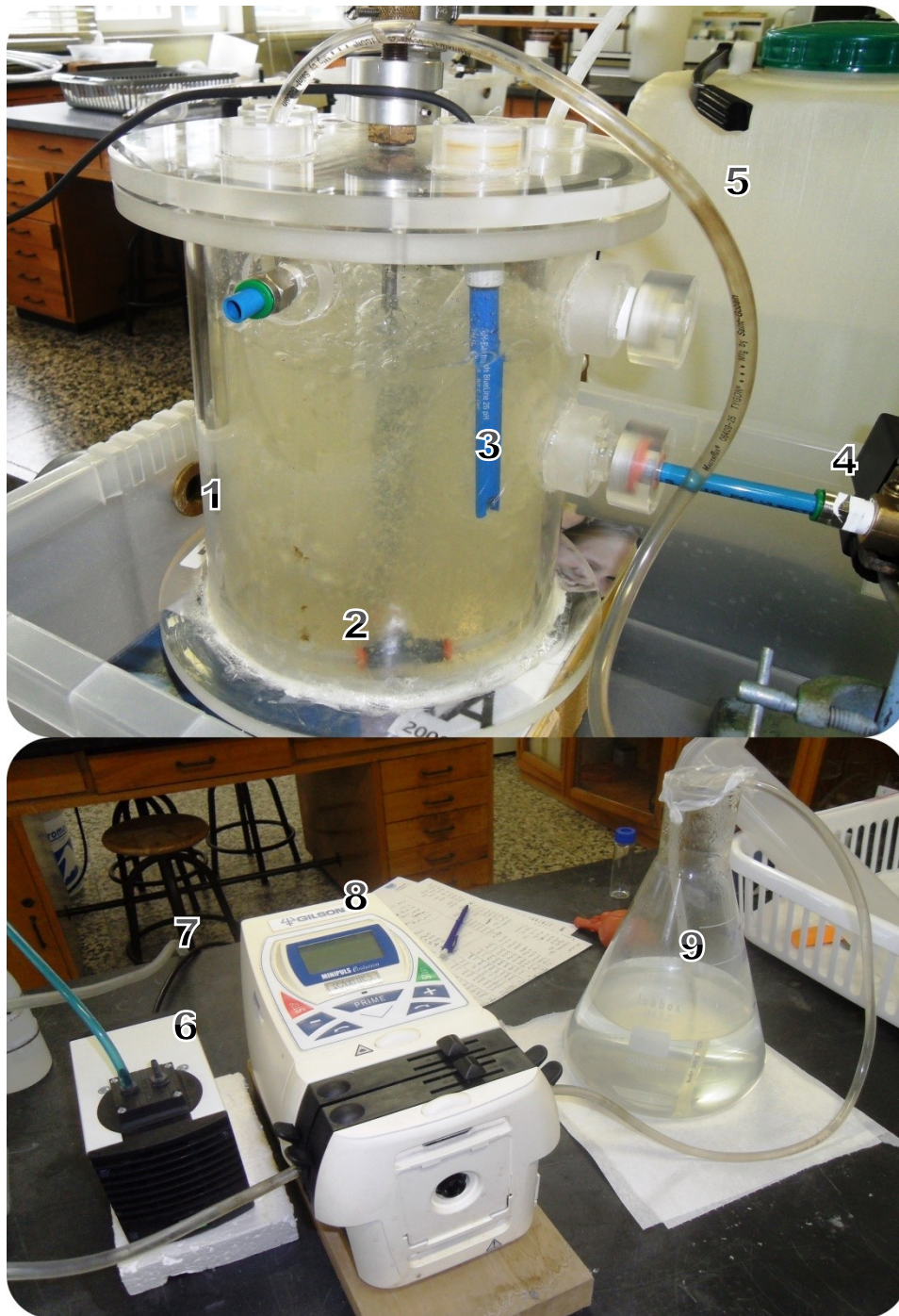


Figura 3.1. Instalação laboratorial. 1 – Reator cilíndrico em arejamento; 2 – Dispersor de ar; 3 – Sensor de pH; 4 – Eletroválvula que permite a libertação do sobrenadante; 5 – Tubo que conduz a alimentação até ao reator; 6 – Bomba de ar; 7 – Mangueira que conduz o sobrenadante do reator até ao recipiente de recolha (não apresentado na figura); 8 – Bomba peristáltica que introduz a alimentação no reator; 9 – Alimentação.

3.2. Inóculo e alimentação

O inóculo utilizado no início da operação foi uma suspensão de 260 mL de licor misto proveniente de um reator onde já havia acumulação de PHA, em operação na Universidade Nova de Lisboa.

A alimentação introduzida no reator foi um meio nutritivo complexo, composto essencialmente por acetato de sódio cuja composição, apresentada na Tabela 3.1, não foi alterada durante toda a operação do reator. A solução de micronutrientes, adicionada à alimentação com uma concentração de 2 mL/L, possuía a composição apresentada na Tabela 3.2. Este tipo de meio já foi utilizado com sucesso na produção de polihidroxialcanoatos em diversos estudos (Dias, 2008; Lemos et al., 2006; Serafim et al., 2004). No entanto, para este trabalho experimental, alterou-se o procedimento, não se tendo controlado o pH da solução no valor de 7,2, dado que alguma bibliografia também o fizera com resultados semelhantes (Bengtsson, 2009). Esta solução pretende também simular um efluente líquido no sentido de ser tratado em termos de remoção de carbono, azoto e carga orgânica.

Tabela 3.1. Composição do meio nutritivo que constitui a alimentação para 1 L de solução.

Reagente	Fórmula química	Massa (g) ou volume (mL)	Grau de pureza mínimo (%)	Laboratório
Acetato de sódio tri-hidratado	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	4,000	100,00	VWR BDH Prolabo
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,600	99,50	Merck
Cloreto de amónio	NH_4Cl	0,160	99,00	Himedia
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,100	99,50	Himedia
Hidrogenofosfato de di-potássio anidro	K_2HPO_4	0,092	99,00	Panreac
Di-hidrogenofosfato de potássio	KH_2PO_4	0,045	99,50	Merck
Cloreto de cálcio di-hidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,070	99,00	Panreac
Tiourea	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$	0,010	99,00	VWR BDH Prolabo
Solução de micronutrientes		2,00 mL		

A concentração desta solução é de aproximadamente 30 mmol C/L e 1,4 mmol N/L, pelo que a razão C/N é de 21,43 mol/mol. Com esta composição, a alimentação apresenta um valor teórico de carência química de oxigénio de aproximadamente 1773 mg O_2 /L e uma concentração teórica em carbono total (TC) e em azoto total (TN) de 740 mg TC/L e 53 mg TN/L, respetivamente. A concentração de tiourea (10 mg/L) utilizada nesta solução pretende evitar fenómenos de nitrificação no reator (Serafim et al., 2004; Lemos et al., 2006; Carvalho et al., 2007).

Tabela 3.2. Composição mássica da solução de micronutrientes para 1 L de solução.

Reagente	Fórmula química	Massa (g)	Grau de pureza mínimo (%)	Laboratório
Cloreto de ferro (III) hexa-hidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,500	*	<i>Panreac</i>
Ácido bórico	H_3BO_3	0,150	99,50	<i>Pronalab</i>
Cloreto de cobalto (II) hexa-hidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,150	98,00	<i>Panreac</i>
Cloreto de manganês (II) tetra-hidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,120	100,07	<i>VWR BDH Prolabo</i>
Sulfato de zinco hepta-hidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,120	99,50	<i>VWR BDH Prolabo</i>
Molibdato de sódio di-hidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,060	99,50	<i>Merck</i>
Sulfato de cobre (II) penta-hidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,030	99,00	<i>Panreac</i>
Iodeto de potássio	KI	0,030	99,50	<i>VWR BDH Prolabo</i>

Legenda: (*) Dados não disponíveis.

3.3. Modo de operação do reator

A operação do reator foi realizada nas instalações do Departamento de Engenharia Química e Biológica desde o dia 20 de Novembro de 2012, às 11 horas, até ao dia 26 de Agosto de 2013, às 12 horas e 30 minutos, perfazendo, assim, mais de 6400 horas de operação.

O período de operação foi dividido em fases de acordo com o modo de funcionamento pretendido para o SBR, cuja explicação se apresenta de seguida:

Fase A1: esta fase começou no dia 20 de Novembro de 2012, às 11 horas, e terminou no dia 28 de Novembro, às 6 horas. Foi marcada pelo começo de operação e pela ambientação do inóculo ao regime de operação. O principal objetivo desta fase foi o incremento da concentração de biomassa dentro do reator e a sua adequação às condições envolventes. Nesta fase não se efetuou o controlo do pH e da temperatura. O tempo de retenção hidráulico desta fase foi de 3,8 dia. A Figura 3.2 apresenta um diagrama de Gantt representativo da operação diária na fase A1.

	Tempo de duração (h)	
Alimentação (10:45-11:00)		
Arejamento (11:00-07:00)	20,00	
Sedimentação (07:00-10:15)		3,25
Descarga (10:15-10:45)		

Figura 3.2. Diagrama de Gantt representativo do modo de funcionamento do reator na fase A1.

Fase A2: esta fase começou no dia 28 de Novembro de 2012, às 6 horas, e terminou no dia 8 de Janeiro de 2013, às 10 horas e 45 minutos. O principal objetivo desta fase era aumentar a concentração em sólidos no licor misto, uma vez que ainda não se tinha atingido o valor pretendido de aproximadamente 3 g SST/L. Esta concentração de sólidos suspensos totais encontra-se na gama de valores recomendados para tanques de arejamento em regime SBR (Gerardi, 2010) e permite assim uma maior concentração de PHA. Relativamente à fase anterior, aumentou-se o tempo de sedimentação em uma hora (como se pode verificar na Figura 3.3), retirada ao tempo de arejamento, com vista a melhorar o processo de sedimentação e evitar que o sobrenadante retirado do reator apresentasse alguma biomassa, como estava a ocorrer numa grande parte dos ciclos anteriores a esta fase, obtendo-se, assim, um clarificado de maior qualidade.

	Tempo de duração (h)	
Alimentação (10:45-11:00)		
Arejamento (11:00-06:00)	19,00	
Sedimentação (06:00-10:15)		4,25
Descarga (10:15-10:45)		

Figura 3.3. Diagrama de Gantt representativo do modo de funcionamento do reator na fase A2.

Fase B1: esta fase teve início no dia 8 de Janeiro de 2013; às 10 horas e 45 minutos, e foi cessada no dia 4 de Fevereiro, às 14 horas e 30 minutos. Tendo-se considerado que a concentração de biomassa no reator já era satisfatória, procedeu-se a uma significativa mudança na rotina diária do reator, passando-se a operar em dois ciclos diários em vez de apenas um. O objetivo era aumentar a exposição do sistema ao regime *feast/famine* e assim fomentar a produção de polihidroxialcanoatos para cumprir os objetivos inicialmente estabelecidos neste trabalho experimental. Na Figura 3.4, pode-se constatar que, por dia, passaram a existir dois momentos de *feast*, já que é introduzida alimentação duas vezes no reator, e dois momentos *famine*. Esta modificação na rotina diária provocou uma redução no tempo de retenção hidráulico para 1,9 dia.

	Tempo de duração (h)			
Alimentação (10:45-11:00 e 22:45-23:00)				
Arejamento (11:00-21:30 e 23:00-09:30)	10,50		10,50	
Sedimentação (21:30-22:30 e 09:30-10:30)				
Descarga (22:30-22:45 e 10:30-10:45)				

Figura 3.4. Diagrama de Gantt representativo do modo de funcionamento de operação do reator na fase B1.

Fase B2: esta fase iniciou-se no dia 4 de Fevereiro de 2013, às 14 horas e 30 minutos, e teve o seu termino dia 19 de Abril, às 9 horas e 30 minutos. Neste período do ano a temperatura ambiente em Coimbra situa-se abaixo da gama de temperaturas considerada ótima para a produção de PHA, que é de 20 a 23 °C (Coats et al., 2011; Albuquerque et al., 2007; Serafim et al., 2004; Lemos et al., 2006; Krishna & Van Loodsdrecht, 1999). Assim, acrescentou-se à instalação laboratorial um banho de aquecimento (modelo 5, *Julabo*, Alemanha) a 22 °C com o objetivo de aquecer o licor misto através da camisa de aquecimento no reator. Em tudo o resto, mantiveram-se inalteradas as condições de funcionamento.

Fase B3: No dia 19 de Abril foi decidido retirar o aquecimento ao reator uma vez que a temperatura ambiente já era superior à temperatura do banho (22 °C). Então, por volta das 9 horas e 30 minutos, retirou-se o controlo da temperatura, passando esta a estar dependente apenas da temperatura ambiente. Esta foi a última fase do trabalho e acabou com o término da operação do reator, no dia 26 de Agosto às 12h30.

Ocasionalmente houve períodos em que a corrente elétrica que abastecia a instalação laboratorial falhou, cessando a agitação, o arejamento e a alimentação do reator. Quando o corte de energia era planeado, a rotina diária de funcionamento do reator era interrompida, promovendo-se apenas o arejamento através de uma bomba de vácuo portátil.

3.4. Amostragem

Nas primeiras fases de operação do reator, na fase A1 e A2, retiraram-se apenas amostras para monitorizar a evolução da concentração de biomassa no reator e para avaliar a capacidade de tratamento do sistema. Para o efeito, retirava-se cerca de 40 mL de sobrenadante, em todos os ciclos, e 100 mL a 250 mL de licor misto, cerca de uma vez por semana. Na impossibilidade de retirar amostra de clarificado (aos fins-de-semana, por exemplo), recolham-se amostras compostas por vários clarificados.

Já durante a maior parte do período nas fases B1, B2 e B3, a amostragem foi definida com base no conhecimento do regime *feast/famine*. Em dias definidos tiravam-se duas amostras de licor misto em horários diferentes para estas serem analisadas tanto ao nível da quantificação de PHA (seja por análise de imagem ou por cromatografia de gás) como dos restantes parâmetros físico-químicos essenciais para avaliar o grau de tratamento do reator. Foi decidido retirar a primeira amostra diária por volta das 9 horas e 25 minutos o que corresponde ao final da fase de arejamento, ou seja, teoricamente quando a biomassa se encontra na fase *famine*. A segunda amostra diária era retirada normalmente entre as 11 horas e as 11 horas e 20 minutos, poucos minutos depois da entrada da alimentação. Nesta altura era assegurado que o licor misto continha uma maior concentração em acetato (fonte de carbono), correspondendo à fase *feast*.

A Figura 3.5 e a Figura 3.6 esquematizam a amostragem e identificam as análises efetuadas às amostras da fase *famine* e da fase *feast* bem como os respetivos volumes de amostra utilizados. A descrição dos métodos analíticos identificados nestas figuras é efetuada mais à frente neste capítulo. A coloração *Sudan Black* foi realizada em algumas amostras tendo-se, no entanto, abandonado esse procedimento devido à falta dos resultados adequados face à aquisição das imagens em microscopia de fluorescência através da coloração *Nile Blue*.

A amostragem do sobrenadante permaneceu inalterada face ao referido anteriormente. Todas as amostras recolhidas e não analisadas de imediato eram armazenadas no frigorífico a 6 °C.

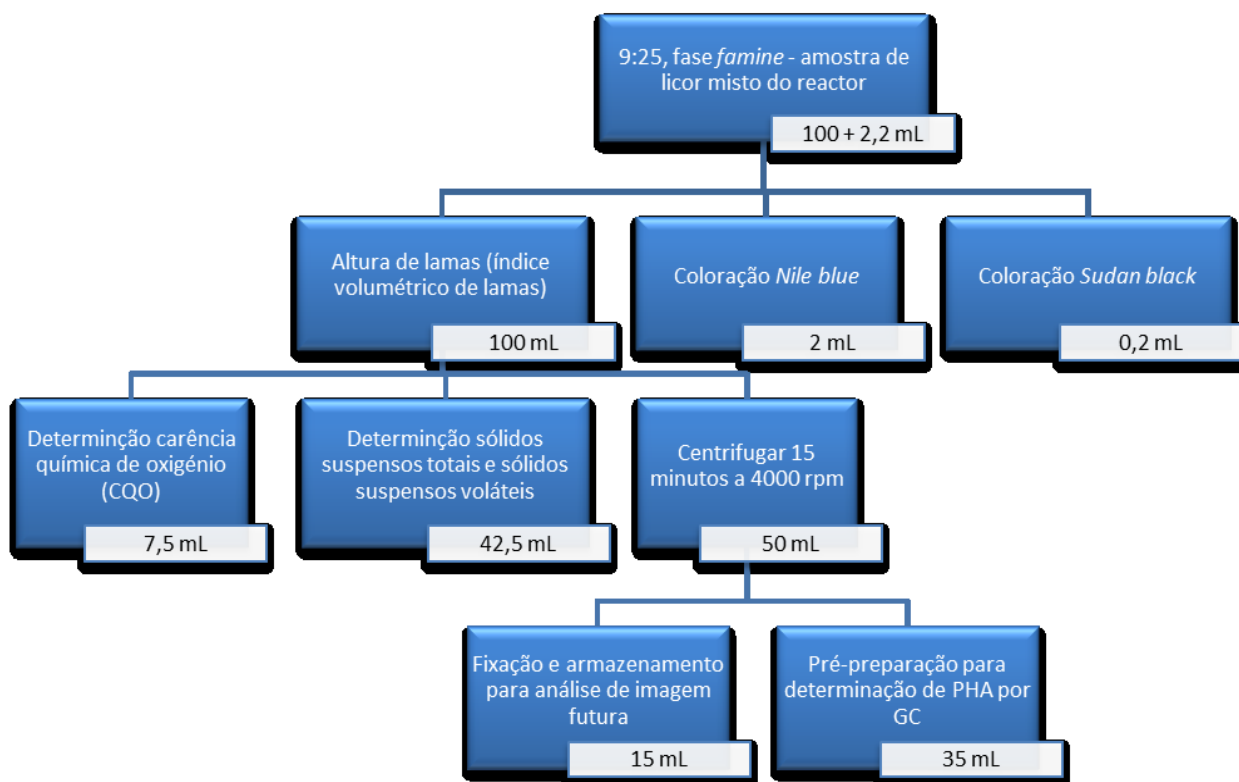


Figura 3.5. Esquema de amostragem para a primeira amostra diária, recolhida por volta das 9 horas e 25 minutos.

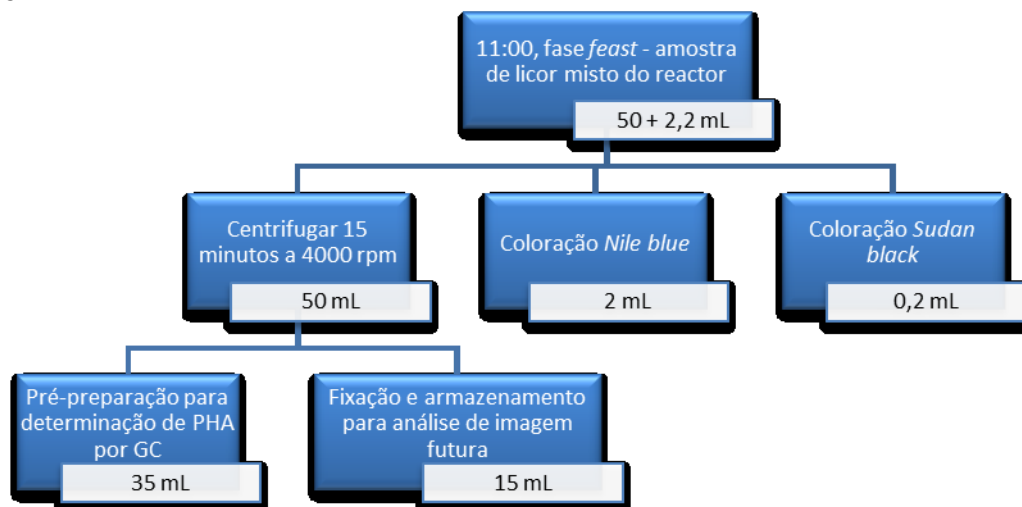


Figura 3.6. Esquema de amostragem para a segunda amostra diária, recolhida por volta das 11 horas.

3.5. Métodos analíticos

Esta secção descreve os métodos analíticos utilizados para fazer a caracterização físico-química do licor misto, do clarificado proveniente do reator e da solução de alimentação utilizada. Os parâmetros físico-químicos determinados foram a carência química de oxigénio das três correntes, a concentração em carbono total e azoto total do clarificado e da alimentação, os sólidos suspensos totais, os sólidos suspensos voláteis e o índice volumétrico de lamas do licor. Determinou-se, ainda, a concentração de polihidroxialcanoatos no licor misto que também se descreve e explica neste subcapítulo. Posteriormente é descrito o método de coloração utilizado para a captura de imagens em microscopia de fluorescência, com o corante *Nile Blue*, e o método de fixação das amostras para posterior armazenamento.

3.5.1. Carência química de oxigénio

A carência química de oxigénio (CQO) é frequentemente utilizada como uma medida da capacidade orgânica oxidável de águas residuais. É definida como a quantidade de oxigénio necessário para oxidar a matéria orgânica de uma dada amostra por ação de um agente oxidante forte sob condições controladas. O oxidante utilizado para esta determinação foi o ião dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) que na oxidação da matéria orgânica é reduzido a ião crómio (Cr^{3+}).

Neste trabalho experimental a CQO foi determinada através de digestão fechada uma vez que é mais económico e gera menos resíduos que o método de determinação em digestão aberta (APHA et al., 1999). O método de deteção utilizado foi o método colorimétrico. Este método de deteção baseia-se na diferença de absorção entre o ião dicromato e o ião crómio. A radiação com um comprimento de onda de 600 nm, é fortemente absorvida pelo ião Cr^{3+} enquanto que a absorção do dicromato é praticamente nula. Este procedimento foi adaptado de *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, secção 5220 D (APHA et al., 1999) e encontra-se descrito no anexo A.

As amostras devem conter um valor de CQO entre 100 O_2/L e 1000 $\text{mg O}_2/\text{L}$. Caso esta gama de valores seja ultrapassada devem-se efetuar diluições. As amostras de licor misto e de alimentação foram diluídas, por estarem muito acima da gama referida, segundo um fator de 1:20 ou 1:25 e de 1:8, respetivamente. Foram efetuadas réplicas em triplicado de cada amostra. Os resultados não devem discordar mais de $\pm 5\%$ da sua média para valores de CQO elevados. Se as amostras, padrões e brancos forem determinados sob as mesmas condições, a concentração de matéria orgânica, expressa em mg CQO/L , pode ser calculada pela curva de calibração.

Para além das amostras de licor misto e de alimentação, foi também efetuada esta análise ao sobrenadante. Caso as amostras de sobrenadante contivessem partículas (biomassa) depositadas na base do recipiente, realizavam-se duas análises, uma com agitação da amostra, o que constituía o procedimento normal, e outra sem qualquer agitação.

3.5.2. Carbono total

O carbono é um macronutriente quase universal, indispensável a todos os organismos, uma vez que constitui a fonte de energia para o crescimento celular e é a unidade base do material celular.

Existem dois tipos de carbono que podem ser encontrados em águas, o carbono orgânico e o inorgânico. O carbono orgânico é o carbono que forma ligações com o hidrogénio e o oxigénio formando compostos orgânicos enquanto o carbono inorgânico é a base estrutural de compostos inorgânicos tais como os compostos carbonatados. Estas duas formas de carbono constituem o chamado carbono total (TC).

Esta análise foi feita simultaneamente com a determinação de azoto total (referida a seguir) a amostras de clarificado, como forma de estudar a capacidade de remoção de carbono demonstrada pelo reator SBR. A concentração em TC foi determinada por análise infravermelho não dispersiva com combustão oxidativa através de um analisador de carbono orgânico total (modelo *TOC-V CPN*, Shimadzu, Japão) acoplado a um amostrador automático (modelo *ASI-V*, Shimadzu, Japão). Após injeção na corrente de 150 mL/min de ar (ar sintético 5.0, UN 1956, Linde, Alemanha), o carbono total é aquecido e oxidado cataliticamente até aos 680 °C no tubo de combustão, o que provoca a sua conversão em dióxido de carbono. Posteriormente a corrente gasosa é arrefecida e desumidificada, e de seguida levada a um depurador de halogénios, onde são removidos o cloro e os outros halogénios. A deteção do dióxido de carbono é feita na célula de um analisador de gás por espectrofotometria de infravermelho não dispersiva (NDIR). O detetor NDIR gera um sinal analógico, um pico cuja área é medida pelo *software* do equipamento. A área do pico é proporcional à concentração de TC na amostra e assim é possível determinar a concentração de carbono total recorrendo a uma curva de calibração previamente definida a partir de padrões de hidrogenoftalato de potássio (Shimadzu, 2001).

Para grande parte das amostras foi aplicada uma diluição de 1:2 em água destilada, uma vez que as concentrações ultrapassavam a gama de concentrações de operação do aparelho.

3.5.3. Azoto total

O azoto é um macronutriente essencial no meio ambiente, necessário na estrutura e no metabolismo celular de todos os organismos, já que é constituinte de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, entre outros. No entanto, um excesso na concentração de azoto, na sua forma não oxidada, em recursos aquíferos pode levar a uma diminuição nos níveis de oxigénio dissolvido com consequências negativas para organismos afetados. Algumas das principais fontes poluidoras de azoto poderão ser estações de tratamento de águas residuais, efluentes provenientes do escoamento de terrenos fertilizados ou do escoamento de áreas de armazenamento de estrume e animais, falhas em sistemas sépticos e descargas industriais contendo inibidores de corrosão (EPA, 2013).

Há quatro formas de azoto comumente medidas em águas: azoto amoniacal, azoto orgânico, nitratos e nitritos. O azoto total inclui o azoto de Kjeldahl total, que abrange o azoto amoniacal, o azoto orgânico e o azoto reduzido, os nitritos e os nitratos (EPA, 2013), sendo a concentração de

nitritos normalmente reduzida e pouco relevante. Todas estas formas azotadas podem ser metabolizadas por diferentes organismos e fazem parte do ciclo do azoto.

Neste trabalho experimental apenas se determinou a concentração em azoto total (TN), não se especificando nenhuma das suas formas reduzidas ou oxidadas. Esta análise foi feita aos sobrenadantes como forma de estudar a capacidade de remoção de azoto no reator SBR. A concentração em TN foi determinada por quimioluminescência com combustão oxidativa através de um analisador de carbono orgânico total (modelo *Total N Measuring Unit TNM-1*, Shimadzu, Japão) acoplado de um amostrador automático (modelo *ASI-V*, Shimadzu, Japão). Depois de entrar no aparelho, o azoto total é oxidado a monóxido de azoto no tubo de combustão a uma temperatura de 720 °C. O gás de transporte, ar (ar sintético 5.0, UN 1956, Linde, Alemanha), após passar pela câmara de combustão, é arrefecido e desumidificado. É necessário referir que o azoto molecular do gás de transporte não entra em decomposição nas condições da câmara de combustão tal como o TN (Shimadzu, 2001). De seguida o gás entra num analisador de gás por quimioluminescência onde o NO é detetado. O sinal de deteção do analisador de gás gera um pico cuja área é medida pelo *software* e que permite a medição da concentração de azoto total na amostra através de uma curva de calibração previamente definida a partir de padrões de nitrato de potássio (Shimadzu, 2001).

Uma vez que esta análise é efetuada em simultâneo com a de carbono total, as amostras analisadas são as mesmas, pelo que também foi utilizada uma diluição de 1:2 em água destilada.

3.5.4. Sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis

Em águas residuais, o termo sólidos refere-se à matéria sólida suspensa ou dissolvida nos efluentes. Os sólidos podem ser de origem doméstica ou industrial ou podem provir da erosão natural, sendo, neste caso, essencialmente de origem mineral. Afetam a qualidade da água de diversas formas: não só conferem um paladar inferior à água de consumo como podem torná-la inadequada para diversos usos industriais, no caso do seu excesso de mineralização, por exemplo.

Os sólidos totais dividem-se em dois grandes grupos: os sólidos suspensos totais e os sólidos dissolvidos totais. Os sólidos suspensos são a porção de sólidos que fica retida num filtro de 2,0 µm (ou menos) de porosidade nominal sob condições específicas. Sólidos dissolvidos são a porção de sólidos que passam neste tipo de filtros (APHA et al., 1999). Neste trabalho determinar-se-ão os sólidos suspensos usando filtros *Whatman* GF/C de fibra de vidro com uma porosidade de 1,2 µm.

Os sólidos também se podem categorizar quanto à sua volatilidade: sólidos voláteis ou sólidos não voláteis. Os primeiros constituem a porção de sólidos que volatiliza sob condições de combustão da matéria orgânica (550 °C), causando a perda de massa da amostra. Esta massa de sólidos voláteis não é precisamente igual à massa de matéria orgânica já que a perda de massa ocorrida na combustão também pode incluir perdas devido à decomposição e/ou volatilização de alguns sais minerais (APHA et al., 1999).

O procedimento seguido para a análise deste grupo de parâmetros foi adaptado do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, secções 2540 D e 2540 E (APHA et al., 1999).

Os filtros de fibra de vidro (*Whatman* GF/C ϕ 47 mm; categoria nº 1822-047) foram inseridos no sistema de filtração com bomba de vácuo (*Gelman Sciences*, E.U.A.) e lavados com 3 porções de 20 mL de água destilada, aplicando vácuo até à remoção de todos os vestígios de água. Depois da filtração, os filtros foram transportados para cadinhos (de porcelana) previamente identificados. Na estufa (*Auxilab*, S.L., Espanha) os cadinhos com os filtros foram secos durante cerca de 15 min a 105 °C. Foram então retirados e deixados arrefecer num exsiccador até peso constante (A gramas com variação <4% ou <0,5 mg), pesados numa microbalança (modelo AG204, *Mettler Toledo*, E.U.A.) e mantidos no exsiccador até serem necessários.

Para efetuar a filtração da amostra, colocou-se o filtro num sistema de filtração por vácuo, inicialmente humedecido ligeiramente com água destilada. Filtraram-se de seguida 15 mL a 25 mL de amostra, para que o resíduo total estivesse entre 2 mg e 200 mg. Filtraram-se posteriormente 3 volumes sucessivos de 10 mL cada de água destilada como forma de lavar o filtro. O filtro foi então cuidadosamente removido e deixado secar na estufa a 105 °C durante 1 h. Posteriormente o cadinho com o filtro foi colocado no exsiccador até peso constante (variação <4% ou <0,5 mg) e seguidamente pesado (B gramas). Finalmente, colocou-se o cadinho com o filtro na mufla (*Thermo Scientific Heraeus*, E.U.A.) a 550 °C \pm 50 °C durante 15 a 20 min. Posteriormente, o cadinho com o filtro foi arrefecido num exsiccador até peso constante e finalmente foi pesado (C gramas).

Estas determinações foram efetuadas em duplicado assegurando-se assim a exatidão das mesmas (APHA et al., 1999). A concentração em sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis foram determinadas pelas expressões (3.1) e (3.2).

$$[SST] = \frac{(B - A) \times 1000}{V} \quad (3.1)$$

$$[SSV] = \frac{(B - C) \times 1000}{V} \quad (3.2)$$

Em que [SST] significa concentração em sólidos suspensos totais, em mg/L e [SSV] concentração em sólidos suspensos voláteis, em mg/L; A refere-se à massa do conjunto cadinho + filtro, em mg; B à massa do conjunto cadinho + filtro + amostra seca na estufa a 105 °C, em mg, e C à massa do conjunto cadinho + filtro + amostra volatilizada na mufla a 550 °C, em mg. V representa o volume de amostra em mL. As concentrações de sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis referem-se às médias das respetivas concentrações determinadas em duplicado.

3.5.5. Índice volumétrico de lamas

O índice volumétrico de lamas (IVL) pode ser considerado como um dos melhores métodos para avaliar a capacidade de sedimentação do licor misto (Davis, 2010; APHA et al., 1999). Uma boa capacidade de sedimentação num sistema de lamas ativadas é fulcral para atingir bons níveis de tratamento, o que pressupõe um clarificado com uma baixa concentração de sólidos. Este índice define-se pelo volume, em mililitros, ocupado por um grama de suspensão (peso seco) após 30 minutos de sedimentação.

Neste trabalho experimental determinou-se o volume de biomassa sedimentada (V_x), em mL, após 30 minutos de sedimentação numa amostra de licor misto previamente agitada com um volume total de 98 mL a 101 mL com uma proveta de 100 mL ou 250 mL. O índice volumétrico de lamas (IVL), em mL de suspensão/ mg de SST, foi então calculado a partir da expressão (3.3). Nesta igualdade, V representa o volume total de amostra, em L, e $[SST]$ a concentração em sólidos suspensos totais, em mg/L.

$$IVL = \frac{(V_x/V) \times 1000}{[SST]} \quad (3.3)$$

A Tabela 3.3 indica qual a qualidade de sedimentação das lamas através do valor do IVL.

Tabela 3.3. Qualidade de sedimentação das lamas em função do valor do índice volumétrico de lamas. Adaptado de (Davis, 2010).

Valor de IVL (mL/g SST)	Qualidade de sedimentação das lamas
< 100	Boa
100 a 150	Moderada
> 150	Fraca (<i>bulking</i> e outros fenómenos)

3.5.6. Determinação da concentração de PHA (PHB e PHV)

A quantificação físico-química dos polímeros de reserva poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e poli(3-hidroxivalerato) (PHV) na biomassa do licor misto foi realizada através de cromatografia gasosa. Devido à localização dos polihidroxialcanoatos no interior celular e à elevada sensibilidade deste tipo de determinação é necessário haver uma prévia preparação das amostras no sentido de purificar os polihidroxialcanoatos.

A preparação das amostras de biomassa em suspensão foi efetuada da forma seguidamente descrita. Foi colocada uma amostra de biomassa em suspensão (35 mL) num tubo de fundo cónico de 45 mL (tipo *Falcon*) e adicionados 15 mL de solução de formaldeído 2% (v/v) a cada tubo. O formaldeído cessa a atividade biológica, evitando assim a possível degradação do PHB durante o processamento das amostras (Veira, 2005). De seguida, os tubos foram centrifugados na centrífuga (modelo *B4i*, *Jouan*, França) a 4000 rpm durante 15 min. Com uma pipeta, retirou-se a solução límpida sobrenadante. Como não se prosseguiu imediatamente com o procedimento seguinte, colocou-se o tubo de fundo cónico no congelador. Quando se retomou a determinação, retirou-se o recipiente do congelador e foi deixado a descongelar à temperatura ambiente durante alguns minutos.

Centrifugou-se o conteúdo do *Falcon* novamente a 4000 rpm durante 15 min e retirou-se o sobrenadante. O tubo foi colocado na estufa (*Auxilab*, S.L., Espanha) a 60 °C durante 48 h para secagem total do *pellet* de biomassa. Após 48h, retirou-se o *Falcon* da estufa e foi mantido no exsiccador (até massa constante) até se realizar a digestão.

Depois de completa a separação da biomassa do sobrenadante e do seu conteúdo aquoso, iniciou-se o procedimento de digestão, em que ocorre a hidrólise do polímero. Pesou-se 4 mg a 15 mg de biomassa numa balança analítica (modelo *AG204*, *Mettler Toledo*, E.U.A.), posteriormente colocada em tubos de digestão de borossilicato (16 mm x 100 mm) com rolhas roscadas revestidas a teflon. A variação da biomassa pesada deveu-se às diferentes concentrações de PHA na amostra. Numa *hotte*, adicionaram-se a todas as amostras 5 mL de diclorometano (solvente) e 1 mL de solução do padrão interno (PI) de ácido benzoico em diclorometano (1 mg/mL). O uso de um padrão interno neste tipo de determinações aumenta a precisão do método, pois poderá eliminar eventuais erros de manuseamento das amostras. Foi preparado, também, pelo menos um padrão previamente colocado num tubo de digestão e um ensaio em branco (sem amostra) de maneira análoga às amostras. Este procedimento tem a intenção de despistar eventuais interferências de fatores externos. Adicionou-se a todos os tubos de digestão (com as amostras, os padrões e o branco) 1,5 mL de PI e 1,5 mL de solução de 1-propanol:HCl (75:25 v/v). A preparação das soluções padrão é referida no anexo B. Os tubos foram selados com as rolhas apropriadas tendo o cuidado de verificar se estas se encontravam em bom estado. Agitou-se vigorosamente no sentido de favorecer o contacto inicial dos reagentes com a biomassa ou com os padrões. De seguida, os tubos foram colocados no digestor a 100 °C durante 3,5 h. O digestor é constituído por dois recipientes, com 10,5 e 10,9 cm de altura, com aberturas de tamanho suficiente para se ajustarem aos tubos de digestão, e por um bloco de aquecimento adjacente capaz de operar a 100° C \pm 2 °C. Finalmente, retiraram-se os tubos do digestor e foram deixados arrefecer à temperatura ambiente.

O passo seguinte foi a extração líquido-líquido dos ácidos livres e de outros compostos polares com água ultrapura e a posterior partição entre fases. Aí ocorre uma reação de esterificação da qual resulta o éster benzil e o éster hidroxialquilo (PHB e PHV) (Veira, 2005). São estes ésteres que são identificados e quantificados na análise cromatográfica. Depois de verter o conteúdo dos tubos de digestão já frios para frascos de vidro de 10 mL, esses tubos foram lavados com 1 mL de água ultrapura do tipo 1 ASTM, seguidamente agitados e o seu conteúdo vertido para dentro dos frascos. Os frascos foram então selados com rolha butil cinzenta e cápsula de alumínio. Agitou-se vigorosamente (~1 min), assegurando assim que as duas fases entrassem completamente em contacto, otimizando a extração. Os frascos foram invertidos durante, pelo menos, 20 min para permitir a separação das fases. A fase desejada é a mais pesada, ou seja, a fase orgânica que contém o éster. Com uma seringa descartável retirou-se cuidadosamente 1 mL da fase inferior (éster), de forma a evitar a mistura das fases, e transferiu-se a fase orgânica para *vials* de 2 mL (de vidro escuro). É de notar que os resíduos celulares localizam-se na interface das duas fases. No final, foi adicionado Na₂SO₄ até formar um precipitado branco, assegurando-se a desidratação total da fase orgânica. Os *vials* foram posteriormente agitados e, se a análise cromatográfica não fosse efetuada de imediato, guardavam-se a 0 °C.

A análise cromatográfica foi realizada num cromatógrafo gasoso com detetor de ionização de chama (modelo *Clarus 480*, *PerkinElmer*, E.U.A.). Em cada injeção o volume injetado foi de 1 μ L (injetor *split/splitless* em modo *splitless*) através de uma seringa de GC de 1 μ L (*SGE Analytical science*, E.U.A.). Os componentes foram separados usando uma coluna capilar *Elite Wax* (*PerkinElmer*, E.U.A.), 15 m \times 0,53 mm \times 1,0 μ m, com hélio (hélio comprimido, UN 1046, *Linde*, Alemanha), como fase móvel, a 14 kPa (caudal de aproximadamente 5 mL/min). A temperatura do injetor foi de 220 °C e a do detetor FID foi de 250 °C. O perfil de temperaturas do forno foi de temperatura constante de 50 °C dos 0 aos 2 minutos, rampa de temperatura dos 2 aos 12 minutos à razão de 15 °C/min até aos 225 °C e temperatura constante dos 12 aos 19 minutos, a 225 °C. A obtenção e a integração dos cromatogramas foram efetuadas com o auxílio do *software TotalChrom* (*PerkinElmer*, E.U.A.), com uma atenuação de 8x.

Durante um certo período, o GC-FID habitualmente utilizado para a determinação da concentração de PHA, não pôde operar, pelo que se usou outro equipamento (do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho) para efetuar esta análise. Nesse GC-FID (modelo 3800, *Varian Inc.*, E.U.A.), uma coluna capilar TRWAX (*Teknokroma*, Espanha) foi utilizada para separar os componentes. Foi também utilizado o hélio como fase móvel mas a 1 mL/min. O volume injetado, as temperaturas do injetor e do detetor FID e o perfil de temperaturas no forno foram iguais aos utilizados na análise com o outro aparelho. A obtenção e a integração dos cromatogramas foram efetuadas com o auxílio do *software Star Chromatography Workstation v. 6.30* (*Varian Inc.*, E.U.A.).

A identificação dos picos foi efetuada a partir dos tempos de retenção dos padrões respetivos.

A calibração do método foi efetuada correlacionando a razão entre a área do pico do éster hidroxialquilo (PHB ou PHV) e a área do pico do éster benzil (padrão interno) com a massa de polímero (PHB e PHV) correspondente. Deve-se ter em atenção que o padrão utilizado foi uma mistura de 88% de PHB com 12% de PHV.

3.5.7. Fixação das amostras para visualização ao microscópio

A fixação das amostras de licor misto é fulcral para manter a quantidade e a qualidade do PHA no interior celular até que as devidas análises sejam efetuadas. Este procedimento de fixação foi realizado antes de congelar as amostras, com o objetivo de analisá-las posteriormente em microscopia de fluorescência. Para cumprir este objetivo foram adicionadas uma solução salina de tampão fosfato (PBS) e uma solução aquosa de formaldeído. A solução PBS é normalmente utilizada para preparar suspensões celulares uma vez que providencia ao meio condições isotónicas, ideais para manter a viabilidade celular. O cloreto de sódio na solução PBS fornece a proteção osmótica necessária enquanto que os fosfatos incluídos na solução ajudam a estabilizar o pH fisiológico. Já o formaldeído, como já foi referido, tem o papel de cessar a atividade biológica.

Os 15 mL de suspensão celular provenientes do reator SBR foram centrifugados na centrífuga (modelo *B4i*, *Jouan*, França) durante 15 min a 4000 rpm. Depois de removido o sobrenadante, lavou-se e ressuspendeu-se em 7,5 mL de PBS. Foram efetuadas mais duas centrifugações à suspensão celular durante 2 min a 4000 rpm e descartado o sobrenadante. Adicionou-se 2,5 mL de PBS e

ressuspendeu-se novamente. De seguida, foram adicionados 7,5 mL de solução aquosa de formaldeído a 4% e foi a incubar durante 2 horas a 4°C. Seguidamente, centrifugou-se de novo a suspensão e descartou-se o sobrenadante. Lavou-se com 7,5 mL de PBS e centrifugou-se novamente duas vezes à mesma velocidade de rotação e durante o mesmo período que anteriormente. Depois de remover o sobrenadante, ressuspendeu-se com 3,750 mL de PBS e 3,750 mL de etanol 96%. Finalmente, guardaram-se as amostras já fixadas no congelador a -16 °C em microtubos tipo *Eppendorf*.

3.5.8. Coloração *Nile Blue*

A coloração *Nile Blue* foi desenvolvida para visualizar a presença de grânulos de polihidroxialcanoato (PHA) nas bactérias. O método envolve uma coloração com o fluorocromo *Nile Blue* que cora os grânulos lipofílicos de PHA de vermelho, mediante a determinação a um comprimento de onda de emissão na gama dos 625 nm a 675 nm, em microscopia de epifluorescência. Este procedimento de coloração foi adaptado de Ostle & Holt (1982). Para efetuar a ressuspensão do volume de sobrenadante retirado utilizou-se uma solução aquosa de cloreto de sódio a 0,9 %. Depois do processo de coloração, fez-se uso de um *tissue grinder* para quebrar os flocos mais densos e de maior volume. Foram depositados 10 µL de amostra corada em lâminas para observação ao microscópio através de uma micropipeta com a ponta seccionada com o objetivo de não afetar a concentração de biomassa do volume transposto.

Para esta coloração, foi utilizado cerca de 1,5 mL de suspensão celular fixa, colocada num tubo de ensaio. Adicionou-se uma gota da solução aquosa de *Nile Blue* 1% (m/v) e introduziu-se o tubo de ensaio na estufa (*Auxilab*, S.L., Espanha) a 55° C durante 10 min. Posteriormente centrifugaram-se as amostras na centrífuga (modelo *B4i*, *Jouan*, França) a aproximadamente 4500 rpm durante 5 min e retirou-se o sobrenadante. Lavou-se a suspensão com uma solução aquosa de NaCl a 0,9% (m/v) e retirou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se então numa solução aquosa de ácido acético a 8% (v/v), agitou-se durante aproximadamente 1 minuto e centrifugou-se novamente a aproximadamente 4500 rpm durante 5 min, com o objetivo de remover o excesso de solução de coloração. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se com a solução de NaCl 0,9%. Da suspensão resultante, introduziram-se cerca de 2 mL de suspensão celular corada no *tissue grinder* durante cerca de 1 minuto. Finalmente, colocou-se 10 µL de amostra corada em cada uma de três lâminas e observou-se no microscópio de fluorescência (modelo *BX51*, *Olympus*, Japão) a uma ampliação total de 400x e a um comprimento de onda de excitação de 530 a 550 nm.

3.5.9. Aquisição e análise das imagens

A aquisição das imagens foi efetuada através do microscópio de epifluorescência *Olympus BX51* (*Olympus*, Japão) e da câmara acoplada *Olympus DP25* (*Olympus*, Japão) a 400x de ampliação total. Foram adquiridas 150 imagens (50 por lâmina) a um comprimento de onda de excitação de 530 nm a 550 nm e filtro com barreira de emissão a partir dos 591 nm. A partir deste comprimento de onda de excitação resultam imagens de grânulos de PHA apresentando fluorescência vermelha, com comprimento de onda de emissão de 625 nm a 675 nm. A resolução das imagens adquiridas foi de 1360x1040 pixéis com um formato de 24-bits em sistema RGB (8 bits para cada canal). A aquisição foi realizada através do *software cell^B* (*Olympus*, Japão).

A identificação e a quantificação do PHA através de análise de imagem foram baseadas na determinação das inclusões de PHA que apresentam fluorescência. Este procedimento algo complexo, apresentado na Figura 3.7, foi semelhante ao usado por Mesquita et al. (2013). Primeiro, o programa de processamento baseado em *Matlab* (*Mathworks*, E.U.A.) divide a imagem RGB nos seus três canais compostos, vermelho, verde e azul, mas apenas trabalha subsequentemente sobre o canal vermelho uma vez que corresponde à gama de comprimentos de onda à qual os grânulos fluorescem. Foi seguidamente efetuada a correção de *background*, através da introdução de um filtro *top hat* (a regiões de 100 pixéis) e de um filtro *Wiener*. A identificação das regiões de PHA foi realizada de duas maneiras, conforme as inclusões de PHA se encontravam bem ou mal definidas. Nas regiões em que as inclusões eram bem definidas, foi aplicado novamente um filtro *top hat* (a regiões de 30 pixéis) seguido da segmentação (binarização) e do preenchimento das arestas. Já nas regiões com inclusões mal definidas, empregou-se a segmentação baseada em *threshold*, para a sua binarização. Ambas as regiões das inclusões (bem e mal definidas) foram depois combinadas numa única imagem, posteriormente tratada para a eliminação de detritos por erosão e reconstrução. A imagem binária resultante foi usada para determinar a área total das regiões de PHA e subsequentemente serviu de “imagem máscara” às imagens originais e às imagens com correção de *background*. Após este tratamento, foram determinados parâmetros de intensidade média e total das regiões das inclusões bem como a intensidade global das imagens originais no canal vermelho e das respetivas imagens com correção de *background*.



Figura 3.7. Representação esquemática do algoritmo de análise de imagem utilizado para quantificação do PHA em amostras de licor misto. Adaptado de (Mesquita et al., 2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desempenho do reator no tratamento do efluente

Um dos objetivos desta tese é demonstrar a eficácia de um sistema de produção de polihidroxialcanoatos no tratamento de águas residuais. Para efetuar essa análise há que avaliar a performance do reator no que toca à sua capacidade de tratamento, ou seja, à capacidade de remoção de carbono, azoto e carga orgânica do efluente. Devido ao modo de funcionamento, é também necessário monitorizar a capacidade de sedimentação das lamas do reator SBR, através da determinação do IVL. Outro dos parâmetros a avaliar é a concentração de sólidos no reator, nomeadamente a concentração de sólidos suspensos totais (SST) e de sólidos suspensos voláteis (SSV). Estas concentrações não só permitem calcular uma concentração específica de polihidroxialcanoatos no reator (concomitantemente à concentração mássica), como também analisar o desempenho do processo de tratamento de efluentes. A temperatura e o pH são determinantes no funcionamento deste tipo de sistemas já que se tratam de sistemas de tratamento biológico, em que as populações de microrganismos são afetadas por estes fatores.

A Figura 4.1 apresenta a evolução da temperatura do licor misto dentro do reator ao longo do tempo de operação. É possível verificar que, durante as fases A1, A2 e B1, do dia 20 de Novembro de 2012 até ao dia 4 de Fevereiro de 2013, a temperatura do licor misto variou consoante a temperatura ambiente, dos 12,0 °C até ao 18,0 °C. Já durante a fase B2 (do dia 4 de Fevereiro até dia 19 de Abril), em que foi efetuado o controlo da temperatura a 22 °C, o reator manteve-se a uma temperatura relativamente constante à exceção do período de 11 a 15 de Fevereiro em que o aquecimento foi desligado devido a reparações na camisa de aquecimento. Na fase B3, em que se excluiu o controlo da temperatura, a temperatura do licor misto variou entre os 18,0 °C e os 28,0 °C. Nesta fase, destacam-se dois períodos em que se registaram valores de temperatura em dois patamares distintos. No primeiro, do dia 4 de Fevereiro até ao dia 28 de Junho, a temperatura variou entre os 18 °C e os 23 °C, enquanto que no segundo período, do dia 1 de Julho até ao final da operação, variou entre os 24,5 °C e os 28,0 °C. Para efeitos desta discussão, podem-se então considerar quatro fases distintas no que toca à evolução da temperatura no reator.

Esta análise é bastante relevante uma vez que quer o tratamento do efluente quer o enriquecimento da cultura microbiana em PHA são processos bastante dependentes da temperatura (Krishna & Van Loodsdrecht, 1999; Jiang, 2011).

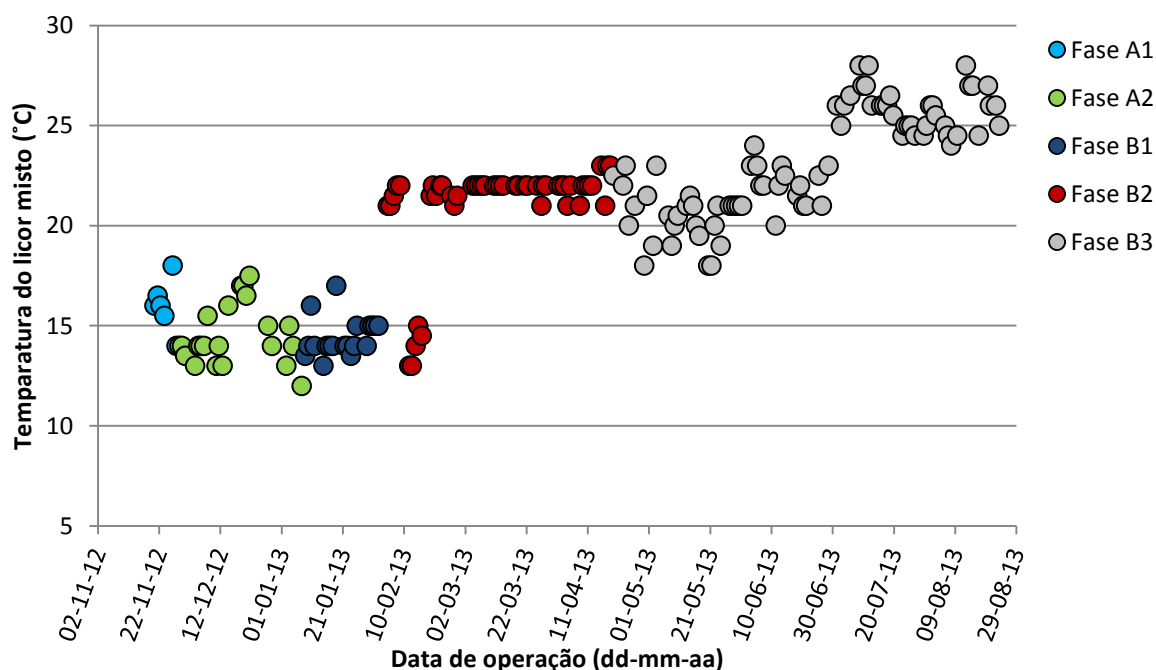


Figura 4.1. Evolução da temperatura do licor misto (em °C) ao longo da operação do reator.

Em relação à monitorização do pH do licor misto, esta foi marcada por um erro no equipamento de medição, que fez com que os valores de pH medidos em contínuo até ao final de Março fossem eliminados. Posto isto, o pH passou a ser medido aquando da recolha da amostra de licor misto. No período monitorizado, a partir de 17 de Abril, o pH do licor misto apresentou-se sempre ligeiramente alcalino e não se registou uma variabilidade muito relevante (sempre inferior a 10%), tendo variado entre os 7,96 e os 8,83. Contabilizando todos os valores a média dos valores de pH no licor misto é de $8,59 \pm 0,22$.

Neste trabalho experimental não se controlou o pH já que, segundo a bibliografia (Dionisi et al., 2005; Serafim et al., 2004), este parâmetro não parece afetar a capacidade para armazenar PHA, desde que a operação seja realizada na gama dos 6,5 aos 9. No entanto, Chua et al. (2003) mostrou que é possível otimizar o processo, produzindo um maior conteúdo celular em PHA na gama dos 8 aos 9. Neste caso, e mesmo sem qualquer controlo, todos os presentes dados experimentais, à exceção de um, inserem-se nessa gama.

Para avaliar o comportamento do processo de tratamento, foram determinadas as concentrações de carbono e azoto totais. Na Figura 4.2 são apresentadas as concentrações de carbono total do sobrenadante e da alimentação. Como se pode verificar, as concentrações de TC da alimentação apresentam algumas variações inesperadas, dos 463,52 mg TC/L até aos 803,60 mg TC/L, afastando-se em alguns casos do valor teórico previsto de 740 mg TC/L. Este tipo de variações poderá ser explicado pela degradação dos reagentes que compõem a solução de alimentação. Ao longo do tempo de operação, com o frequente manuseamento dos reagentes, aumenta a exposição à humidade e à temperatura ambiente, podendo alterar o seu grau de pureza original. Estas alterações têm bastante relevância na preparação das soluções de alimentação, uma vez que, apesar das pesagens rigorosas, estas influenciaram as massas reais dos reagentes, alterando a composição das

soluções. No caso do carbono total, o acetato de sódio (fonte de carbono) tem especial influência nesta concentração. Embora neste caso o acetato de sódio seja tri-hidratado, este composto é uma substância higroscópica, pelo que tem tendência a absorver humidade do ar. A consequência poderá ser um menor grau de pureza deste reagente e, consequentemente, uma menor concentração de TC na alimentação. Isso explicaria o fato de os valores de TC diminuírem significativamente na fase B2 e B3.

Essa diminuição é ainda mais evidente no que toca à concentração de azoto total na alimentação, como se pode verificar na Figura 4.4. Os valores de concentração de TN apresentam uma tendência de diminuição, que vai desde os 65,36 mg TN/L, registados pouco depois do início da operação, até ao mínimo de 15,46 mg TN/L, registado no dia 9 de Agosto. A razão encontrada para esta tendência é novamente a diminuição gradual do grau de pureza dos reagentes que compõem a alimentação ao longo do tempo de operação. Neste caso, os reagentes que têm uma influência relevante na concentração de TN da alimentação são o cloreto de amónio, o EDTA e a tiourea. Particularmente o cloreto de amónio e o EDTA são reagentes higroscópicos pelo que, tal como o acetato de sódio, poderão ter um grau de pureza mais reduzido depois de algum tempo de exposição ao ar ambiente em resultado da absorção de vapor de água. No caso da concentração de azoto total, este tipo de erros experimentais são mais significativos, já que a concentração de TN na alimentação é bastante mais reduzida do que a concentração de carbono total.

Também foi medida a concentração de carência química de oxigénio nas amostras de alimentação. Esses valores constam na Figura 4.6, onde se pode verificar que a CQO da alimentação apresenta uma variabilidade assinalável, dos 792,00 mg O₂/L aos 2458,67 mg O₂/L, com uma média de 1798,86 ± 683,04 mg O₂/L. Em parte, a razão para a variabilidade dos valores de CQO é semelhante à razão dada para a explicação dos valores de TC, ou seja, as alterações no grau de pureza dos reagentes, nomeadamente do acetato de sódio que tem uma influência marcada na CQO da alimentação, provocando a diminuição dos valores de CQO no final da operação. No entanto, esta razão não explica os baixos valores de CQO nas alimentações de 22 de Dezembro e de 10 de Janeiro, que parecem ter tido alguma influência nos valores de CQO dos sobrenadantes dos ciclos seguintes. No que toca à amostra de alimentação do dia 14 de Fevereiro, deverá ter ocorrido alguma contaminação ou erro aquando da determinação da CQO uma vez que o valor é bastante dispar (e quatro vezes maior) de todos os outros, além de não parecer ter tido efeito nos valores dos sobrenadantes seguintes. Por estas razões, este valor não foi considerado para efeitos do cálculo da eficiência de remoção de CQO.

Ainda em relação à alimentação, houve duas alimentações introduzidas no reator com concentrações, quer de carbono total, quer de azoto total, mais reduzidas, nos dias 28 de Maio e 8 de Julho, identificadas na Figura 4.2 e na Figura 4.4. Estes valores foram resultado de diluições à alimentação efetuadas por motivos operacionais. De referir que estas situações foram excecionais e que, nos ciclos posteriores às mesmas, a alimentação introduzida era semelhante à habitual, pelo que não foram consideradas no cálculo da eficiência de remoção de carbono total e de azoto total. Curiosamente, apesar de bastante divergentes das demais, estas concentrações mais baixas não

parecem ter tido qualquer impacto nas concentrações de TC e TN do sobrenadante resultante do mesmo ciclo.

As concentrações de TC no sobrenadante no início da operação, ao contrário do que seria de esperar, começaram reduzidas, nos 133,49 mg TC/L, e foram aumentando à medida que o sistema estabilizava, atingindo um máximo de 419,60 mg TC/L. Esta inesperada tendência inicial poderá ser explicada pela maior capacidade do inóculo inicial para a remoção de carbono. Esta capacidade terá diminuído com a aclimatização do licor misto às condições praticadas. A concentração de TC estabilizou em valores aproximadamente constantes a partir de 3 de Janeiro, no entanto, no dia 20 de Fevereiro houve um abaixamento súbito, por razões que os dados disponíveis não permitem identificar. De seguida houve uma subida gradual do valores de TC, até entrar novamente numa fase em que os valores foram aproximadamente constantes, desde o final de Abril até ao final da operação. Nesta fase, os valores variaram entre 290,00 mg TC/L e 426,20 mg TC/L.

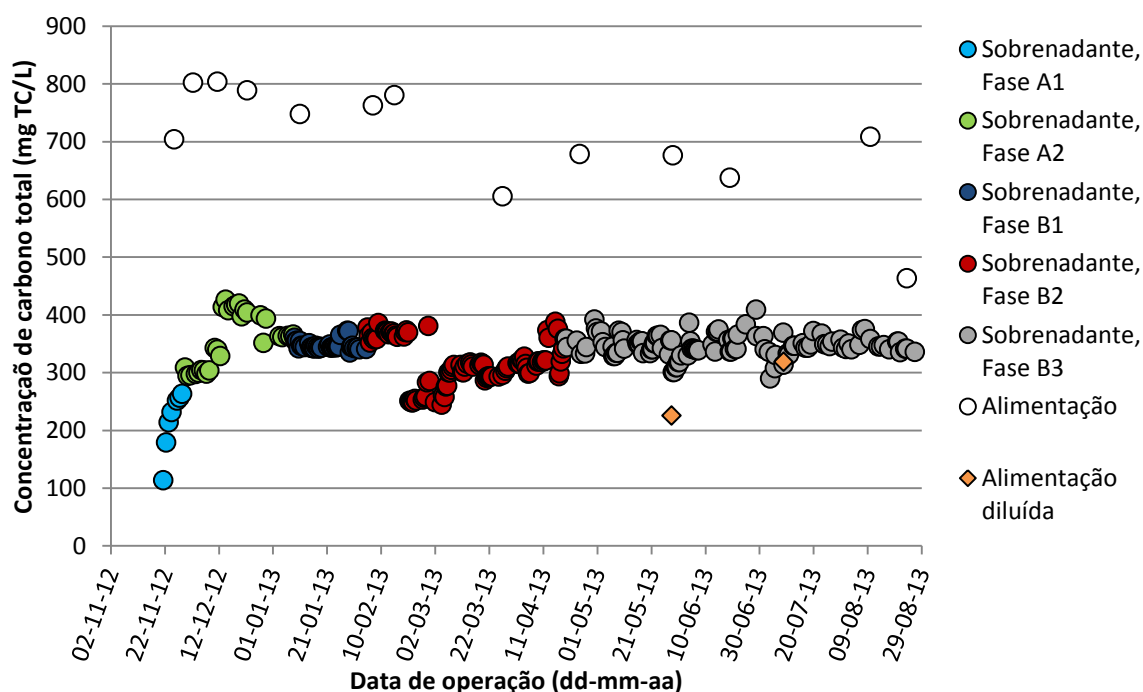


Figura 4.2. Evolução da concentração de carbono total (em mg TC/L) do sobrenadante e da alimentação ao longo da operação.

A eficiência de remoção de carbono total ao longo do tempo de operação é apresentada na Figura 4.3. Devido à variabilidade das concentrações de TC e de TN e dos valores de CQO da alimentação, a eficiência de remoção desses parâmetros foi calculada com base na média dos valores respeitantes às composições conhecidas das alimentações correspondentes. Face à inconstância observada na composição da alimentação, esta foi a solução encontrada mais plausível para a eficiência de remoção ser a mais próxima possível da realidade, ainda que tenha limitações. Por exemplo, quando os valores de duas análises consecutivas da alimentação são bastante distintos, a média pode não representar bem a realidade do valor (TC, TN ou CQO) da alimentação

para todos os valores de sobrenadante correspondentes, afetando, por isso, o cálculo da eficiência de remoção.

O valor máximo de eficiência de remoção de TC foi de 83,88%, logo no início da operação, quando o sistema ainda não se encontrava estável, e o valor mínimo de 27,55%. No entanto, 88% das amostras apresentaram valores de eficiência de remoção entre os 40% e os 60%, o que representam índices de eficiência de remoção não muito elevados, pelo que se poderá colocar a hipótese de este processo não ter sido adequado à remoção de carbono do efluente.

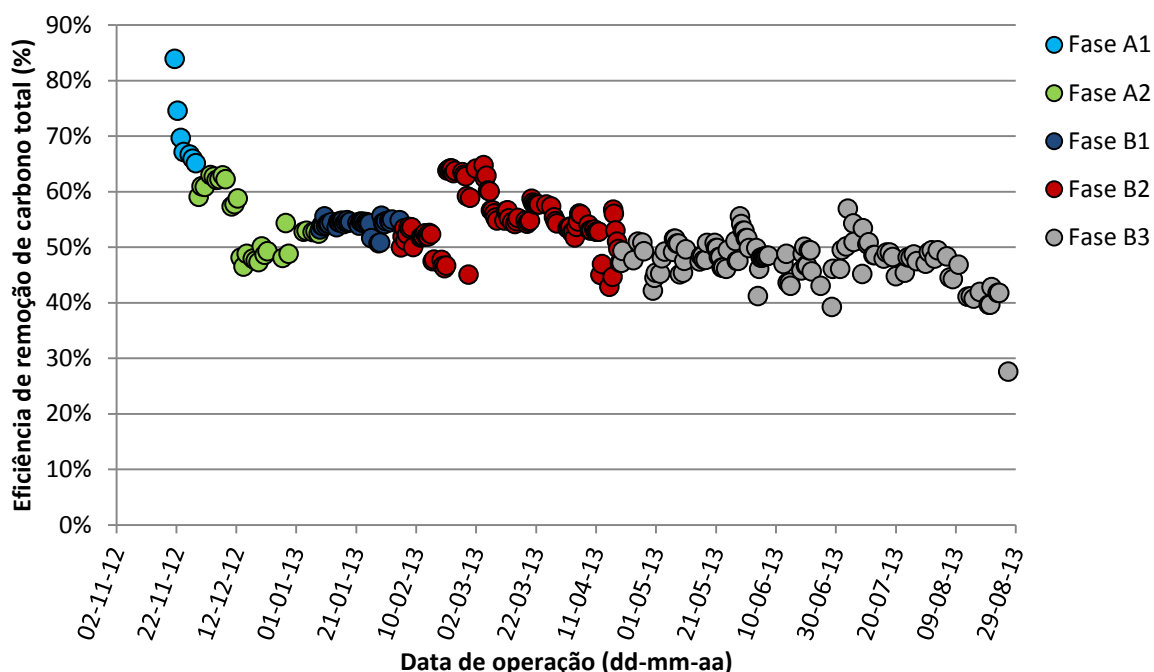


Figura 4.3. Evolução da eficiência de remoção de carbono total (em percentagem) no sobrenadante ao longo da operação do reator.

A Figura 4.4 apresenta, para além da evolução da concentração em azoto total do sobrenadante e da alimentação ao longo da operação, a comparação do TN do sobrenadante com o VLE estabelecido no Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto, Anexo XVIII, com o valor de 15 mg TN/L. A evolução da concentração de TN começou com um primeiro período em que a população de microrganismos se estava a adaptar ao regime de funcionamento do SBR. No início da fase A2, em que a concentração variou entre os 14,19 mg TN/L e os 27,56 mg TN/L, houve um aumento tanto nos valores de TN quanto nos valores de TC. Este aumento terá sido uma resposta do sistema à alteração efetuada no modo de funcionamento do reator, com a alteração para a fase A2, que aumentou o tempo de sedimentação mas reduziu o tempo de arejamento. Esta alteração na rotina diária do reator teve por objetivo melhorar a qualidade do sobrenadante e, apesar de não ter tido efeito imediato, pode-se dizer que resultou a médio prazo uma vez que a concentração de TC e TN diminuiu nos ciclos seguintes. À exceção desse período, a tendência global da concentração de azoto total é de descida ao longo do tempo de operação, que, pelo menos em parte, se deverá à redução da concentração de azoto na alimentação, anteriormente referida. A concentração de TN evoluiu de 27,66 mg TN/L, registados no dia 14 de Dezembro, até aos 3,71 mg TN/L, o valor mínimo de toda a

operação, respeitante aos sobrenadantes resultantes do segundo ciclo de tratamento de 1 de Agosto e do primeiro ciclo do dia seguinte. Houve alguns valores que se distanciam desta tendência, motivados por ocorrências de uma fraca sedimentabilidade do licor misto, que provocam a contaminação do sobrenadante com biomassa. Essa tendência descendente permitiu que 72% dos sobrenadantes tivessem valores de TN abaixo do VLE de 15 mg TN/L, estabelecido no Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto – Anexo XVIII. Se se considerar apenas as fases B2 e B3, em que as temperaturas foram mais propícias ao metabolismo microbiano, essa percentagem sobe para 96% de sobrenadante com concentrações em TN abaixo do VLE. No entanto, neste caso, não é possível dizer que há uma correlação entre a temperatura e a remoção de azoto, uma vez que os valores da concentração de TN do sobrenadante parecem descer à medida que os valores de TN da alimentação também descem, pelo que esse será o principal motivo para a descida dos valores de concentração de azoto total.

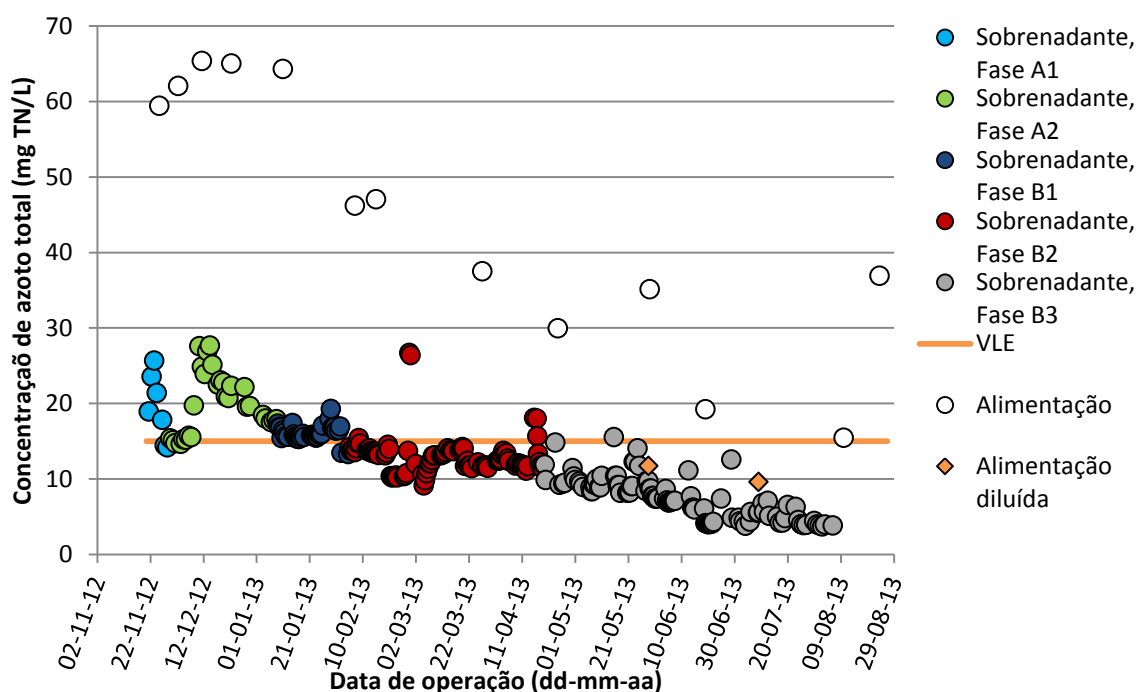


Figura 4.4. Evolução da concentração de azoto total do sobrenadante e da alimentação (em mg TN/L) ao longo da operação do reator. Comparação em relação ao VLE de 15 mg TN/L, estabelecido no Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto – Anexo XVIII.

A eficiência de remoção de azoto total, apresentada na Figura 4.5, é aproximadamente constante, à exceção das fases A1 e A2 e do final da fase B2, em que este parâmetro apresenta uma descida algo abrupta. Note-se que o final da fase B2 foi marcado por alguns problemas de sedimentação e pelo consequente *washout* da biomassa. A maior presença de biomassa no sobrenadante levou ao aumento da concentração de TC e TN (ainda que seja mais visível nos valores de TN), piorando a qualidade do sobrenadante e diminuindo a eficiência de remoção de TC e TN. Ao contrário da eficiência de remoção do carbono total, os índices de eficiência de remoção do azoto total são mais positivos, já que quase 89% dos sobrenadantes registam uma eficiência de remoção de azoto total

acima dos 60%. A eficiência máxima de remoção de TN atingida foi de 84,88% enquanto a mínima situou-se nos 27,54%. Tendo em conta estes valores, pode-se atestar que a capacidade de remoção de azoto apresentada por este sistema é satisfatória.

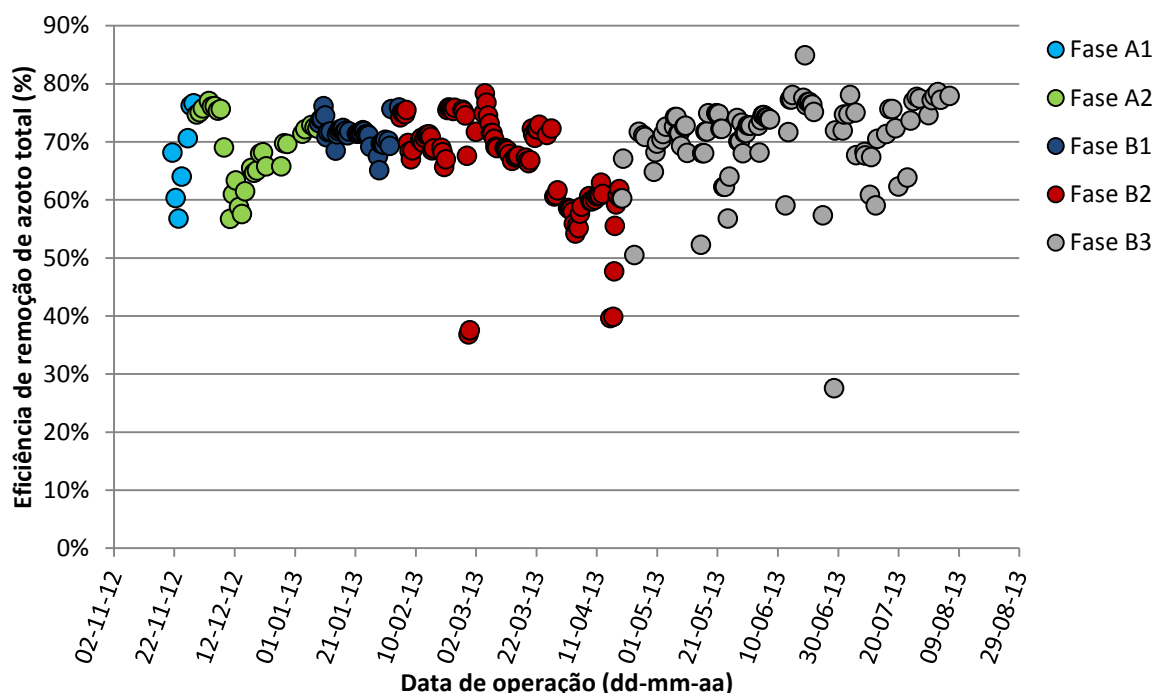


Figura 4.5. Evolução da eficiência de remoção de azoto total (em percentagem) no sobrenadante ao longo da operação do reator.

Como medida da capacidade orgânica oxidável em águas residuais, a medição da carência química de oxigénio de um dado efluente assume especial importância no tratamento do mesmo. A carga orgânica de um efluente de descarga, medida em CQO, tem um valor limite de emissão (VLE) de 150 mg O₂/L, imposta pelo Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto no seu Anexo XVIII, pelo que o desrespeito deste valor incorre em incumprimento legal.

Nesta atividade experimental, foi medida a CQO em amostras de sobrenadante, da alimentação e do licor misto. Na Figura 4.6 são apresentados os valores de CQO do sobrenadante e da alimentação. Da observação dessa figura constata-se que a maior parte dos sobrenadantes não respeita o VLE. Mais especificamente cerca de 75% das amostras apresentam valores superiores a 150 mg O₂/L. No início da operação pode-se verificar que o sobrenadante deixou o reator com maior carga orgânica, registando-se um valor máximo de 424,00 mg O₂/L neste fase. Já com algum tempo de operação (cerca de um mês), a CQO do sobrenadante desceu significativamente para valores abaixo do VLE, mas essa tendência aparente não se manteve. No primeiro ciclo do dia 11 de Janeiro de 2013, registou-se o menor valor de CQO de toda a operação, 48,38 mg O₂/L. Este valor ocorreu num dos períodos em que se registaram valores comparativamente mais baixos relativamente aos da generalidade dos valores de CQO. Ainda que o tempo de retenção hidráulico tenha diminuído para metade (1,9 dia), estes valores poderão de algum modo estar relacionados com a alteração no

regime de funcionamento do SBR, uma vez que coincidem com a alteração para dois ciclos diários de tratamento (fase B1). Segue-se um período em que os valores de CQO do sobrenadante são aproximadamente constantes, no intervalo dos 116,78 mg O₂/L aos 199,00 mg O₂/L. A partir do dia 18 de Junho as concentrações de CQO começam a subir chegando até um máximo de 430,67 mg O₂/L. Estes valores poderão ser explicados em parte pelas dificuldades de separação entre o sobrenadante e o licor misto que ocorreram neste período, dificuldades essas que provocaram o aumento da concentração em sólidos no sobrenadante e consequentemente o aumento da carga orgânica do mesmo. Um dos fatores que podem ter contribuído para estas dificuldades de separação foi a temperatura do licor misto, que aumentou neste período. Com o aumento da temperatura, a atividade bacteriana aumenta, levando também ao aumento da produção e acumulação de secreções insolúveis, como lípidos ou óleos, que ficam presas nos flocos, juntamente com bolhas de ar ou de outros gases (Gerardi, 2002). Este processo dificulta a sedimentação dos sólidos, perturbando a separação entre sobrenadante e licor misto.

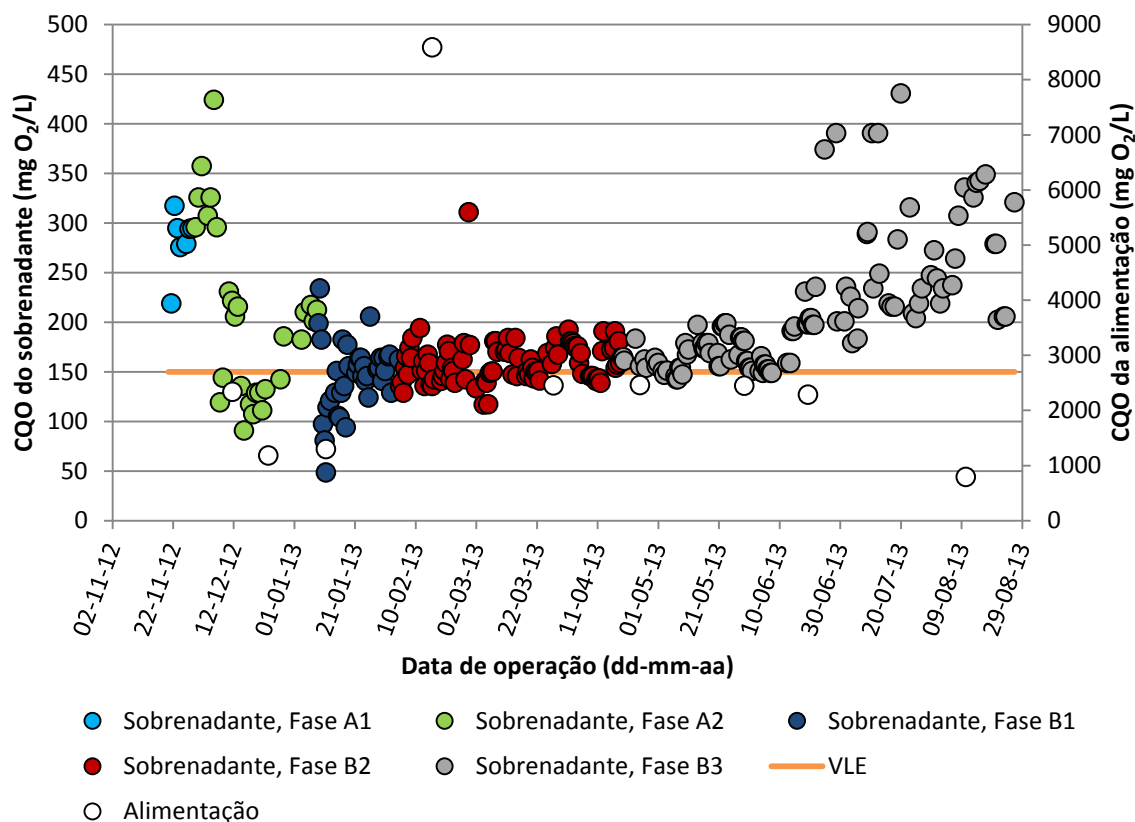


Figura 4.6. Evolução da carência química de oxigênio do sobrenadante e da alimentação (em mg O₂/L) ao longo da operação do reator. Comparação em relação ao VLE de 150 mg O₂/L, estabelecido no Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto – Anexo XVIII.

A Figura 4.7 apresenta a evolução da eficiência de remoção de CQO ao longo da operação. A menor eficiência de remoção de CQO obtida foi no sobrenadante do segundo ciclo do dia 19 de Julho, com o valor 59,67%, justamente no período em que surgiram as dificuldades de separação referidas anteriormente. Aliás, essas dificuldades de separação são bem patentes nos valores de eficiência de remoção apresentados no final da fase B3, já que nenhuma amostra ultrapassa os 90%

de eficiência na remoção da CQO. A máxima eficiência registrada chegou aos 97,42% no dia 11 de Janeiro. Na fase A2, a CQO do sobrenadante parece ter uma tendência contrária às concentrações de TC e TN, já que os valores de CQO descem no início da fase e aumentam no final. Globalmente, em mais de 85% das amostras de sobrenadante foram alcançadas eficiências de remoção de CQO de mais de 85%, o que constitui uma capacidade de tratamento bastante razoável. Ainda assim, como já referido anteriormente, a maior parte dos sobrenadantes não cumpre o VLE neste parâmetro, pelo que este processo de tratamento necessita de alguma otimização ou de um outro processo de tratamento a jusante.

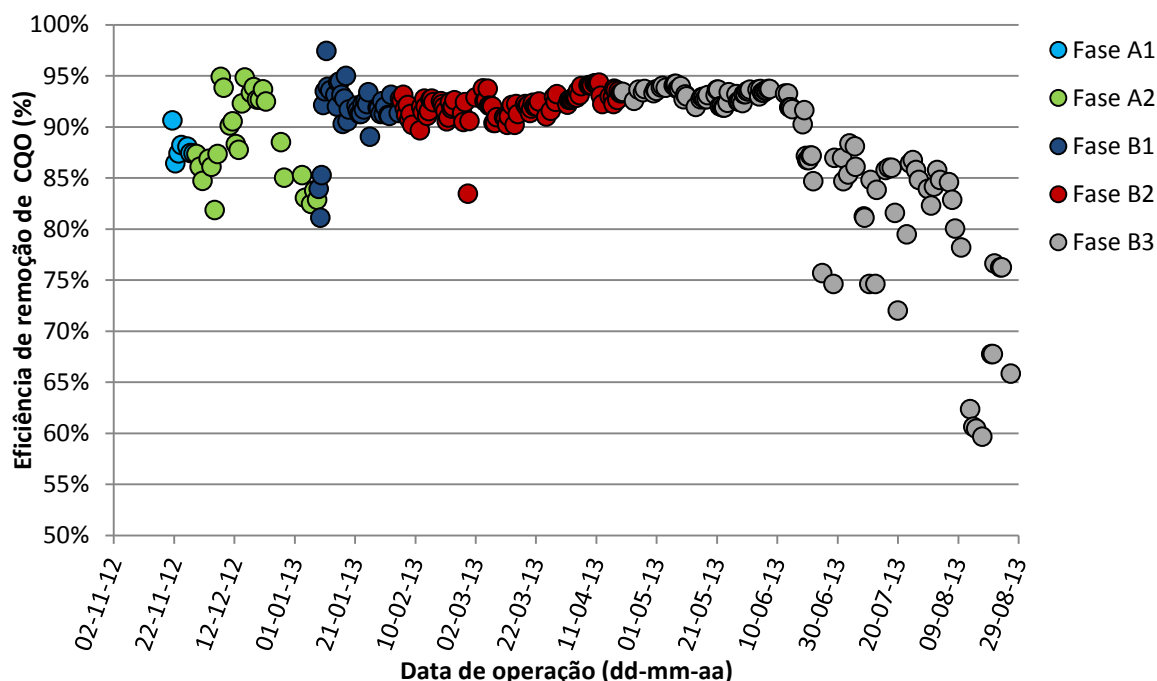


Figura 4.7. Evolução da eficiência de remoção de CQO (em percentagem) no sobrenadante ao longo da operação.

Para avaliar o comportamento do reator, determinou-se ainda a concentração em sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis do licor misto. Determinaram-se também essas concentrações nos sobrenadantes, quando ocorriam problemas de sedimentação e consequentemente perdas relevantes de biomassa com o sobrenadante. A Figura 4.8 apresenta as concentrações de sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis do licor misto ao longo do tempo em que o reator foi operado.

O primeiro valor de sólidos suspensos totais foi determinado a partir de uma amostra retirada 78 horas depois do começo da operação e foi de 576,0 mg SST/L. Nas duas primeiras fases de operação, A1 e A2, a concentração aumentou como era expectável, chegando até aos 4910,0 mg SST/L no dia 16 de Janeiro. A partir do início da fase B1, com a operação a realizar-se em dois ciclos diários, o rácio de aumento da concentração de sólidos suspensos cresceu, de forma que, em 40 dias, essa concentração mais que duplicou para os 10270,7 mg SST/L, registados no dia 25 de Fevereiro. Os SST atingiram uma concentração tão elevada no reator que começaram a ocorrer

problemas de sedimentabilidade, provavelmente causados também por um elevado número de bactérias livres e uma reduzida concentração de protozoários, observadas no sobrenadante a 27 de Fevereiro. Este tipo de condições provocou bastante turvação nos sobrenadantes neste período. Face aos problemas de sedimentabilidade, no dia 28 de Fevereiro, optou-se por diluir o licor misto na razão de um para três com alimentação. Essa diluição provocou, nos ciclos seguintes, uma melhor sedimentabilidade e um sobrenadante mais clarificado. Provocou também uma diminuição abrupta da concentração de SST nesse período, visível na Figura 4.8, registando o valor de 2890,0 mg SST/L no dia 4 de Março.

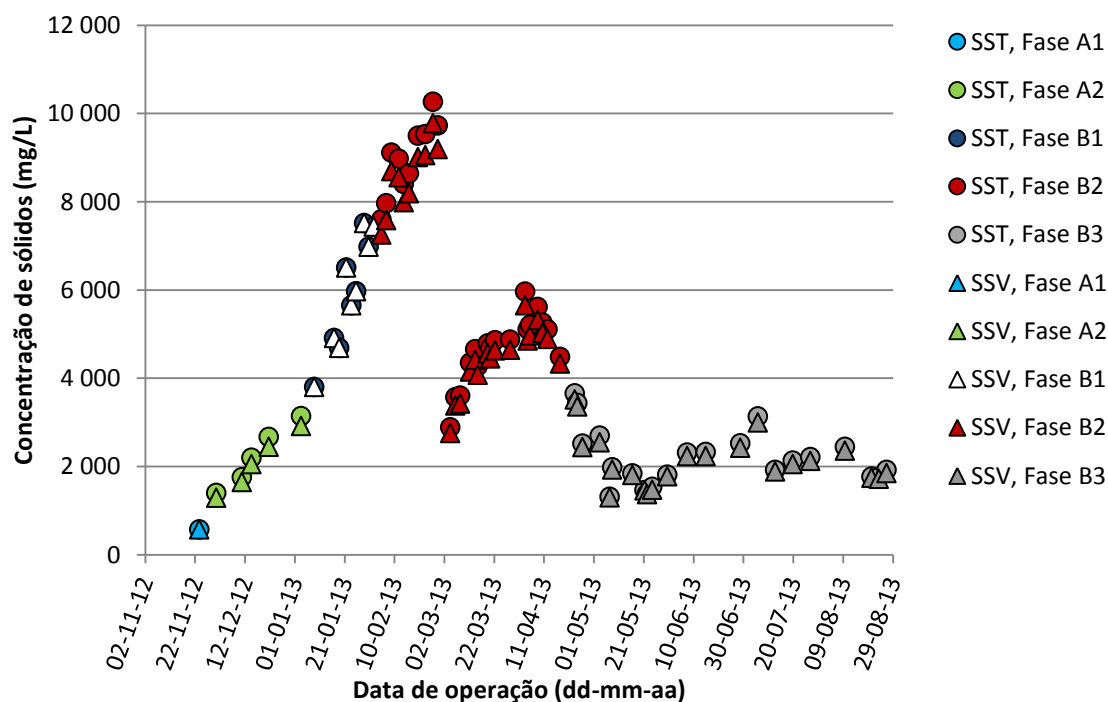


Figura 4.8. Evolução da concentração de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) (em mg SST/L ou mg SSV/L) do licor misto ao longo do tempo de operação.

Nas semanas posteriores os valores de SST continuaram a aumentar mas menos do que anteriormente, já que também se começou a tirar um maior número de amostras de licor misto com o objetivo de efetuar a monitorização da concentração de PHA. Poucos dias depois de atingir um máximo de 5962,7 mg SST/L (amostra do dia 3 de Abril) neste período, a concentração de SST começou a descer, devido a problemas na sedimentação da biomassa, levando a que uma porção significativa do licor misto fosse gradualmente escoada com o sobrenadante. Não havendo crescimento celular para compensar totalmente a saída de biomassa, a concentração de sólidos suspensos totais decresceu até aos 1312,7 mg SST/L. Na Tabela 4.1, estão apresentadas as concentrações de SST e de SSV dos sobrenadantes em que foram registadas relevantes perdas de biomassa e a quantidade dessa biomassa (em mg de SST). Verifica-se que as concentrações são bastante elevadas para um clarificado, dos 485,1 mg SST/L aos 932,6 mg SST/L, superando em muito o VLE de 60 mg SST/L para descargas em meio hídrico, estabelecido no Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto – Anexo XVIII. Considerando estas cinco amostras presentes, percebe-se o porquê da concentração em SST ter descido tão consideravelmente, já que a soma da biomassa

descarregada atinge os 5,61 g de biomassa. De referir que as amostras dos dias 16, 19 e 30 de Abril apresentam volumes de sobrenadante de quase 2 L, já que são amostras compostas por descargas provenientes de dois ciclos, e que a última amostra, pelo contrário, apresenta um volume menor que o normal devido ao entupimento da válvula de descarga do sobrenadante com biomassa.

Tabela 4.1. Concentração de sólidos (SST e SSV) e respetiva massa de SST descarregada dos sobrenadantes que continham perdas relevantes de biomassa durante os problemas de sedimentação.

Data e hora de saída do SN (dd-mm-aaaa hh:mm)	SST (mg SST/L)	SSV (mg SSV/L)	Volume de SN descarregado (L)	Massa descarregada (mg SST)
15-04-2013 10:30	908,5	902,3	1,05	953,97
16-04-2013 10:30	919,1	915,1	1,95	1784,37
19-04-2013 10:30	485,1	472,7	1,95	946,04
30-04-2013 10:30	932,6	900,0	1,80	1678,60
13-05-2013 22:30	493,5	486,5	0,50	246,74

Neste período, os problemas de sedimentação foram provocados, presumivelmente, por um fenómeno de *bulking* viscoso. Apesar de não se terem registado o aparecimento de espumas, a grande quantidade de bactéria *Zoogloea* nas amostras de licor misto observadas em microscopia de campo claro a 15 de Abril é uma das evidências deste tipo de *bulking*. Algumas das principais causas para fenómenos de *bulking* viscoso podem ser a presença de carga orgânica facilmente biodegradável, deficiência de nutrientes no meio (como fósforo ou azoto), um elevado tempo de retenção de lamas ou uma elevada razão F/M (Gerardi, 2010). Este último pode ter sido o motivo principal dos problemas de sedimentação verificados uma vez que a alimentação permaneceu constante e a concentração de SST diminuiu, provocando um aumento súbito na razão F/M.

A partir da terceira semana de Maio, o sistema começou a recuperar dos problemas de sedimentação e consequentemente das perdas de biomassa, o que levou a um ligeiro aumento da concentração de SST até ao máximo de 3132,8 mg SST/L nesta fase. Até ao fim da operação do reator os SST mantiveram-se aproximadamente constantes a rondar os 2000 mg SST/L.

Analisando a Figura 4.8, constata-se que as concentrações de SSV são muito semelhantes às concentrações de sólidos suspensos totais. De facto, a porção de sólidos suspensos que volatiliza sob condições de combustão da matéria orgânica, a 550 °C, constitui sempre mais de 91% do total de sólidos suspensos em todas as amostras, chegando esta percentagem a mais de 99% em alguns casos.

Para tentar obter algum tipo de correlação entre as variáveis mais significativas determinadas no decorrer da operação do reator, foi utilizado o método de regressão linear simples. Através deste método simplista apenas foram encontradas três correlações significativas entre três variáveis. Uma delas foi entre a concentração de sólidos suspensos totais e a concentração de sólidos suspensos voláteis. Como era esperado, a regressão entre a concentração de sólidos suspensos totais e sólidos

suspensos voláteis é extremamente elevada, com um coeficiente de determinação a tender para a unidade ($R^2=0,9998$). Como se pode verificar também na Figura 4.9, os resultados experimentais ajustam-se claramente a uma reta, o que significa que a fração de SSV nos SST manteve-se praticamente constante durante o tempo de operação. Desta regressão, pode-se também confirmar que os SST são, quase na sua totalidade (cerca de 95%), matéria volatilizável (SSV) maioritariamente associada à matéria orgânica suspensa. Poderá dizer-se inclusivamente que, para o presente licor misto, a determinação do SSV seria tendencialmente desnecessária uma vez que com a expressão resultante desta regressão poder-se-ia estimar essa concentração com elevado rigor.

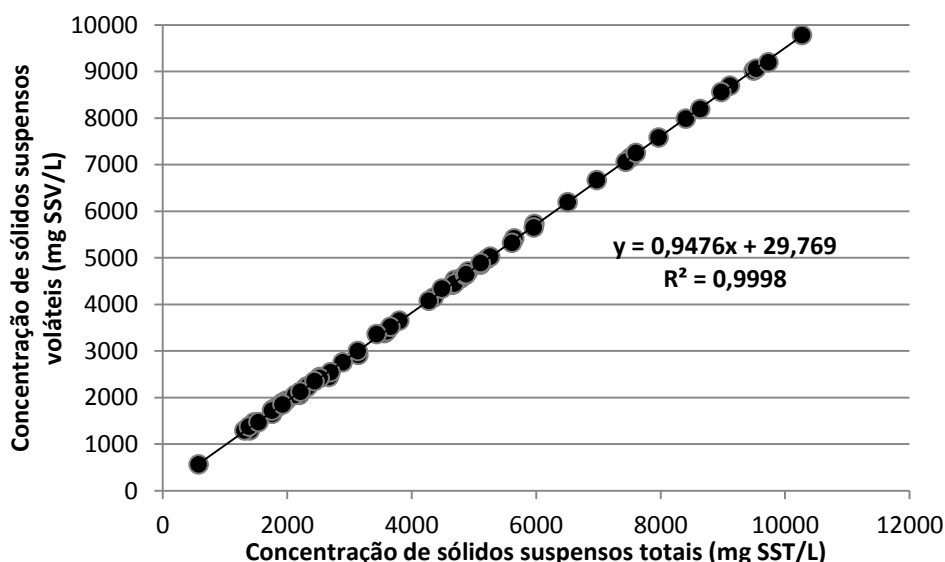


Figura 4.9. Sólidos suspensos totais (em mg SSV/L) vs. sólidos suspensos voláteis (em mg SST/L), com regressão linear simples.

Outro parâmetro determinado no licor misto foi a CQO. A carência química de oxigénio do licor misto ao longo do tempo de operação está representada na Figura 4.10. Pelo que é possível verificar, a evolução deste parâmetro é muito semelhante à evolução da concentração de sólidos suspensos totais. Como já referido anteriormente, os sólidos suspensos do licor misto são quase totalmente constituídos por sólidos suspensos voláteis, ou seja, matéria orgânica volatilizada a 550 °C e apenas uma fração residual de matéria mineral restante após o processo de volatilização. Assim, como a CQO mede a quantidade de oxigénio necessário para oxidar a matéria orgânica de uma dada amostra, neste caso, a CQO e os SST são parâmetros diretamente dependentes.

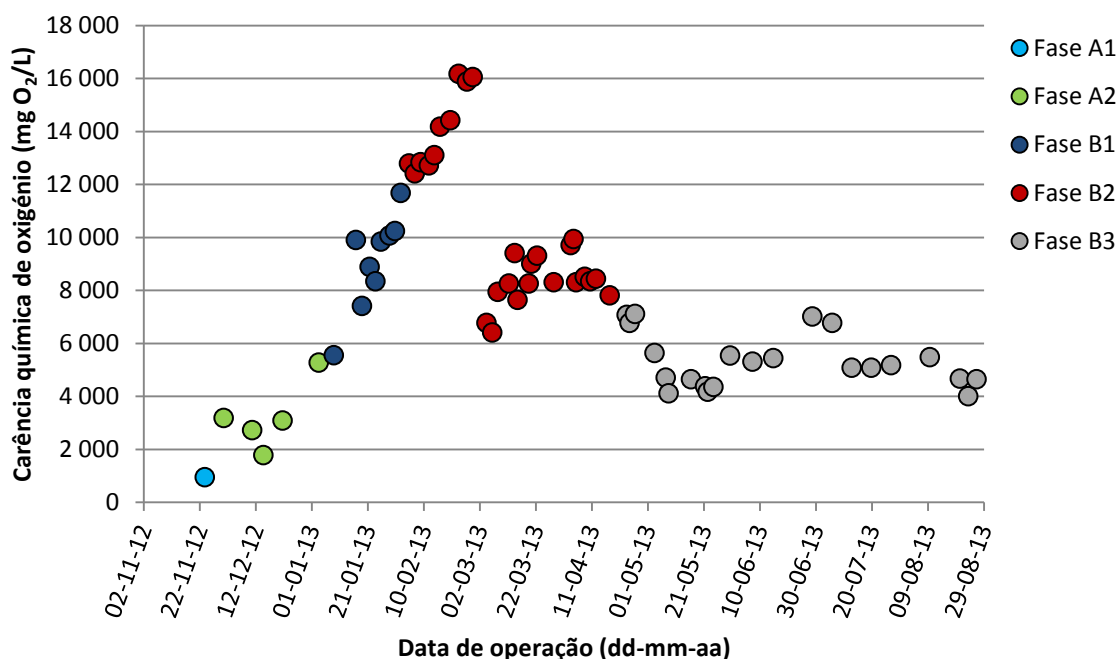


Figura 4.10. Evolução da carência química de oxigênio do licor misto (em mg O₂/L) ao longo da operação do reator.

A carência química de oxigênio do licor misto começou a operação (78 horas após o início) com o valor de 949,00 mg O₂/L. Nas duas primeiras fases de operação, fases A1 e A2, a CQO subiu para o máximo de 5557,78 mg O₂/L. A partir do começo da fase B1, em que passaram a funcionar dois ciclos diários, a CQO começou a subir consideravelmente, mais que triplicando para os 16183,33 mg O₂/L. O decréscimo abrupto de CQO entre a amostra do dia 27 de Fevereiro e a amostra de 4 de Março, dos 16058,33 mg O₂/L para os 6780,00 mg O₂/L, respetivamente, foi causado pela diluição do licor misto já referida, efetuada a 28 de Fevereiro. Posteriormente, a carência química de oxigênio voltou a subir, até aos 9946,67 mg O₂/L, para passados poucos dias voltar a descer de forma significativa para os 4113,33 mg O₂/L. Esta descida deve-se aos problemas de sedimentação verificados durante o mês de Abril e Maio, referidos anteriormente. Tal como os SST, na terceira semana de Maio, a CQO aumentou ligeiramente, não havendo mais alterações significativas até ao final da operação.

Outro resultado proveniente da regressão linear simples, como esperado pelas análises anteriores, é a significativa correlação entre a CQO do licor misto e os sólidos suspensos totais e voláteis, como se pode verificar na Figura 4.11. Esta correlação não é tão elevada como no caso da correlação entre os SST e os SSV, no entanto, os coeficientes de regressão são ainda bastante elevados: 0,9198 para a relação entre a CQO e os SST e 0,9215 para a regressão entre a CQO e os SSV. Comprova-se efetivamente que uma grande fração dos sólidos suspensos voláteis presentes no reator operado é constituída por matéria orgânica oxidável.

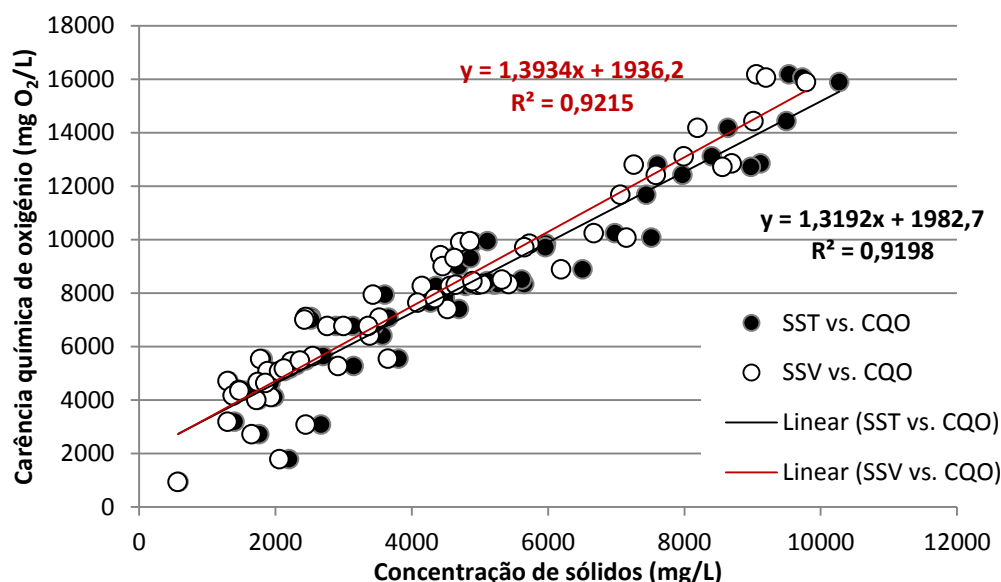


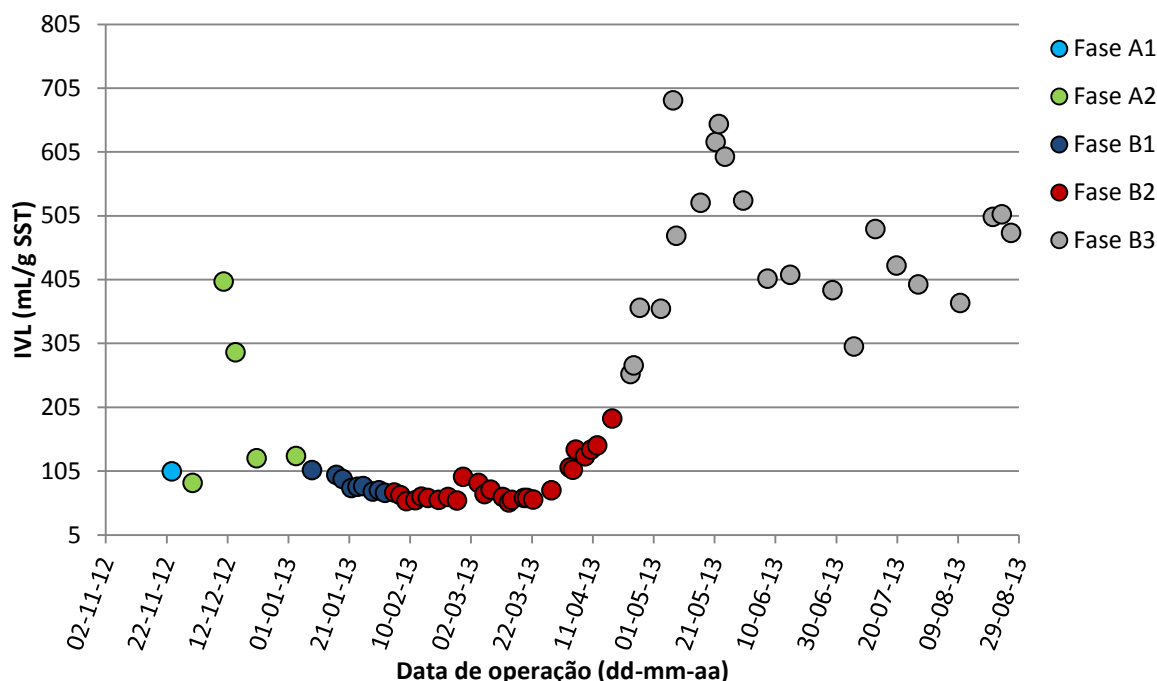
Figura 4.11. Carência química de oxigénio do licor misto ($\text{mg O}_2/\text{L}$) vs. concentração de sólidos suspensos totais (mg SST/L) e sólidos suspensos voláteis (mg SSV/L), com regressão linear simples.

O índice volumétrico de lamas (IVL) é um dos parâmetros mais importantes para avaliar a sedimentabilidade das lamas no tratamento de efluentes. Num reator descontínuo sequencial, o IVL ganha especial relevância, uma vez que, pelo seu paradigma, todo o funcionamento do reator depende da fase de sedimentação da biomassa. Essa é de, facto, uma das limitações deste tipo de reatores.

Nas fases de operação A1, A2, B1 e B2, a qualidade de sedimentação das lamas foi sempre moderada a boa, com valores de IVL abaixo dos 150 mL/g SST , com a exceção de dois valores. No dia 10 e 14 de Dezembro registaram-se IVL's de 401,7 mL/g SST e 291,2 mL/g SST , respetivamente. Com esta fraca sedimentabilidade e a ocorrência de espumas à superfície do licor misto, colocou-se a possibilidade de se estar na presença de um fenómeno de *bulking* filamentoso. No entanto, esta hipótese não foi verificada uma vez que, ao microscópio, não se observaram quaisquer microrganismos filamentosos, indicadores da ocorrência de *bulking* filamentoso (Gerardi, 2002).

Durante a fase B1 e grande parte da B2, a tendência do IVL foi de descida, chegando aos 55,85 mL/g SST . Foi durante este período que se verificaram os 45% de amostras com qualidade de sedimentação dita boa. No entanto, alguns destes valores são enganadores uma vez que foi neste período em que houve problemas de sedimentação devido à elevada concentração de SST no reator com *washout* da biomassa para o sobrenadante e sedimentabilidade bastante fraca. De facto, o IVL, tratando-se de um método empírico, apresenta algumas limitações para valores muito elevados de sólidos – por exemplo, a um licor com uma concentração de sólidos de 10 g/L que não apresenta qualquer sedimentabilidade corresponde um valor de IVL de 100 mL/g SST (Davis, 2010). Face ao seu modo de cálculo (ver expressão (3.3)), como o valor da concentração de sólidos suspensos totais é tão elevado, por pior que seja a sedimentação, o valor do IVL tem tendência para ser reduzido. Assim, nesse período em que a concentração de SST no licor misto foi bastante elevada, a análise deste parâmetro terá que ser efetuada com algumas reservas. A partir do dia 4 de Março, os valores

de IVL aferem melhor a sedimentabilidade das lamas, uma vez que as concentrações de sólidos são mais baixas e, portanto, as limitações causadas pelas elevadas concentrações já não são prementes.



se observaram espumas nem bolhas de gás (N_2 , N_2O ou CO_2), o que põe de lado fenômenos de *foaming* ou de desnitrificação. Também não se verificou a ascensão de lamas mais escuras, devido a oxigenação insuficiente, descartando-se o *rising* das lamas (*rising sludge*), indiciando que os problemas de sedimentação apenas poderão ter sido provocados pela produção de flocos *pinpoint*. A probabilidade deste tipo de dificuldades de sedimentação é considerável, uma vez que, em grande parte dos ciclos deste período, o sobrenadante encontrava-se bastante turvo devido à não sedimentabilidade deste tipo de flocos.

Analisando os valores globalmente, 45,31% das amostras apresentou boa qualidade de sedimentação (valores de IVL abaixo de 100 mL/g SST), 15,63% apresentou uma qualidade moderada (valores de IVL entre 100 e 150 mL/g SST) e as restantes amostras, 39,06%, tiveram qualidade de sedimentação considerada fraca.

4.2. Monitorização da produção de PHA

O objetivo fundamental da monitorização de polihidroxialcanoatos neste estudo é a obtenção de concentrações determinadas por análise cromatográfica para correlacionar com os parâmetros resultantes da análise das imagens da biomassa. No entanto, também é possível analisar a relação da concentração de PHA com outros parâmetros físico-químicos, que poderão ter influência no armazenamento destes polímeros de reserva.

Através das razões entre a área do pico com tempo de retenção correspondente e a área do pico do padrão interno, provenientes da cromatografia de gás, calcularam-se as concentrações de PHB e PHV independentemente. Para determinar o conteúdo em PHA, assumiu-se que a massa deste era igual à soma da massa de PHB e PHV. Esta assunção permite a comparação da concentração de PHA com os parâmetros provenientes da análise de imagem, já que esta não distingue os diferentes tipos de PHA, determinando o PHA conjuntamente. Outra vantagem reside na diminuição do número de variáveis, o que se torna proveitoso para os métodos de análise estatística discutidos no subcapítulo seguinte.

Para esta monitorização, foram retiradas 64 amostras de licor misto, sendo 32 respeitantes à fase *famine* e outras 32 à fase *feast*. No entanto, devido a alguns valores não se encontrarem na gama de valores da reta de calibração do método de determinação de PHA, apenas se contabilizaram 53 amostras, 27 na fase *famine* e 26 na *feast*.

A Figura 4.13, que apresenta os valores determinados da concentração mássica de PHA tanto da fase *feast* como da fase *famine*, demonstra uma tendência de subida da concentração de PHA até ao dia 19 de Março em que é atingido um máximo de 0,37 mg PHA/mg SST na fase *famine*. Posteriormente, até ao final da fase B2, a concentração de PHA começa a descer. Na fase B3 a tendência dos valores da concentração de PHA parece ser semelhante. No entanto, é difícil fazer esta análise uma vez que, de 24 de Maio a 23 de Agosto, é possível verificar a inexistência da monitorização de PHA durante um largo período. Esta interrupção deveu-se aos problemas de

sedimentação referidos anteriormente, problemas estes que não possibilitaram a recolha de amostras para a monitorização do PHA.

Nas amostras da fase *famine*, retiradas poucos minutos antes de começar a fase de sedimentação, os valores de concentração variam entre os 0 mg PHA/mg SST (ausência de qualquer PHA) e os 0,3726 mg PHA/mg SST. Este valor nulo ocorreu numa amostra do dia 23 de Agosto, altura em que o sistema estava com problemas de sedimentação. As amostras retiradas no mesmo período de tempo (23 a 26 de Agosto) são coerentes com esta amostra nula em termos de PHA, já que apresentam também valores de PHA baixos. De registar ainda que as concentrações de PHA da fase *feast* neste período são pouco superiores às da fase *famine*. Estes valores poderão significar que a biomassa teria, neste período, pouca capacidade de armazenamento de PHA.

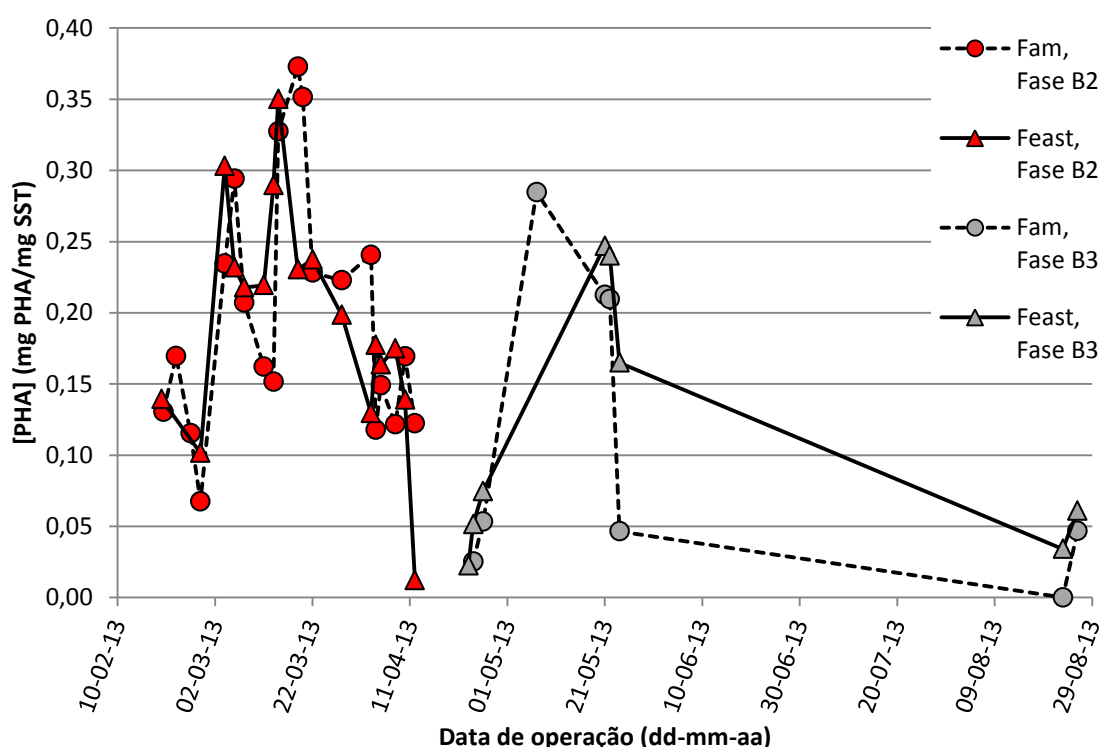


Figura 4.13. Evolução da concentração mássica de PHA (em mg PHA/mg SST) da fase *feast* e da fase *famine* ao longo da fase B2 e B3.

Na amostra de dia 12 de Abril para a amostra de dia 17 do mesmo mês, verifica-se uma redução abrupta na concentração de PHA de 0,1388 mg PHA/mg SST para 0,0122 mg PHA/mg SST. Neste intervalo de tempo, houve duas ocorrências que poderão ter contribuído para este decréscimo. No dia 15, identificou-se a ocorrência de problemas de sedimentação (relatados anteriormente), o que contribuiu para o *washout* da biomassa, havendo menos microrganismos para armazenar PHA. No dia 16 de Abril, por lapso do operador, o reator foi alimentado com água destilada em vez da habitual solução de alimentação. Depois de algumas horas de arejamento, foi suspensa a operação, feita a sedimentação, retirado o sobrenadante e introduzida nova solução de alimentação, com o objetivo de minorar os efeitos da total escassez de nutrientes. No entanto, esta ação poderá não ter sido

suficiente, o que poderá ter resultado no consumo do PHA intracelular devido à falta de fontes de carbono alternativas.

Já na fase *feast*, as amostras possuem concentrações de PHA que variam entre os 0,0122 mg PHA/mg SST e os 0,3500 mg PHA/mg SST. Apesar do valor máximo de conteúdo celular de PHA ser inferior ao valor máximo da concentração de PHA na fase *famine*, os valores respeitantes à fase *feast* são no geral mais elevados, como é possível verificar na Figura 4.13. Para explicar esta diferença surge o conceito de abundância/esgotamento utilizado no processo ADE. Depois de alimentado o reator com a solução da alimentação, o licor misto torna-se bastante rico em fontes de carbono e nutrientes (fase *feast*), o que leva os microrganismos acumuladores a armazenarem PHA intracelular, altura em que a concentração mássica é máxima. Ao longo do tempo de reação (arejamento) a concentração em carbono do licor misto vai diminuindo progressivamente até entrar em esgotamento (fase *famine*). Nessa altura, a pressão seletiva providenciada por este processo é colocada em prática e apenas os microrganismos com reservas poliméricas suficientes sobrevivem. Para continuarem o seu crescimento, poderão usar algum do PHA intracelular, diminuindo assim as suas reservas.

Contudo, existem amostras da fase *famine* em que a concentração de PHA é maior relativamente à amostra da fase *feast* do mesmo dia. Uma das razões prende-se com o facto de as amostras em comparação serem de ciclos diferentes. O ideal seria que as amostras fossem provenientes da fase *feast* e da fase *famine* pertencentes ao mesmo ciclo, no entanto, tal não foi exequível dada a longa duração dos ciclos. Assim as duas amostras são distintamente influenciadas por vários parâmetros, como temperatura e pH distintos, soluções de alimentação eventualmente diferentes, eficiências distintas, anomalias, etc. Outra limitação deste trabalho experimental esteve presente na altura de recolha da amostra na fase *feast*. A amostragem realizada no âmbito da monitorização da produção de PHA baseou-se na aplicação dos princípios do regime *feast/famine*, porém, não foram tidos em conta os perfis de concentração do acetato, fonte de carbono presente na alimentação, neste reator ao longo do tempo de arejamento. Este desconhecimento impossibilita a compreensão cabal do tempo da fase *feast*, pelo que a altura escolhida para tirar amostra (normalmente, até 20 minutos depois da alimentação) poderá não ser aquela em que a concentração de PHA é máxima. Através do conhecimento dos perfis de concentração do acetato deste sistema, poder-se-ia escolher um intervalo de tempo mais adequado para a recolha da amostra tendo por base a identificação do tempo de esgotamento da fonte de carbono.

Como a concentração em sólidos suspensos totais é muito semelhante à concentração em sólidos suspensos voláteis, como é evidenciado no subcapítulo 4.1 (ver Figura 4.9), e admitindo que a totalidade dos sólidos suspensos voláteis são constituídos por biomassa (Serafim et al., 2004; Lemos et al., 2006) e substâncias extracelulares poliméricas (EPS) (Dias, 2008), pode-se estimar que o conteúdo celular máximo em PHA atingido neste trabalho foi superior a 37,26 % (percentagem em peso seco), já que neste trabalho não se contabilizou a quantidade de EPS presente nos SST e SSV. Este valor, aparentemente, é bastante inferior à maior parte dos valores bibliográficos da Tabela 2.1. Contudo, o objetivo geral deste trabalho experimental não passava pela maximização, *per se*, da concentração mássica de polihidroxialcanoatos.

A Figura 4.14 apresenta a evolução da concentração volumétrica de PHA das fases *feast* e *famine*. Esta concentração foi determinada através da concentração de sólidos suspensos totais (SST), uma vez que o licor misto utilizado na determinação de PHA por GC-FID é centrifugado, separado do seu sobrenadante, onde é extraída grande parte dos sólidos dissolvidos, e totalmente seco, constituindo, de grosso modo, os SST. Serafim et al. (2004) e Lemos et al. (2006) efetuam este cálculo a partir dos sólidos suspensos voláteis (SSV), o que é coerente já que a biomassa é, quase na sua totalidade, matéria orgânica volatilizável a 550 °C. No entanto, na biomassa deste trabalho experimental, os SST são bastante semelhantes aos SSV, como se verifica na Figura 4.8, pelo que a diferença de metodologias de cálculo neste caso não é significativa. Outra assunção efetuada para este cálculo é que a concentração de SST é a mesma para as duas amostras do mesmo dia (da fase *famine* e *feast*). Esta assunção foi necessária dado que só se determinou a concentração de SST para as amostras da fase *famine*, não sendo totalmente rigorosa uma vez que, mesmo que não haja alterações dessa concentração durante a sedimentação, existem sempre pequenas quantidades de sólidos que são arrastados com o sobrenadante.

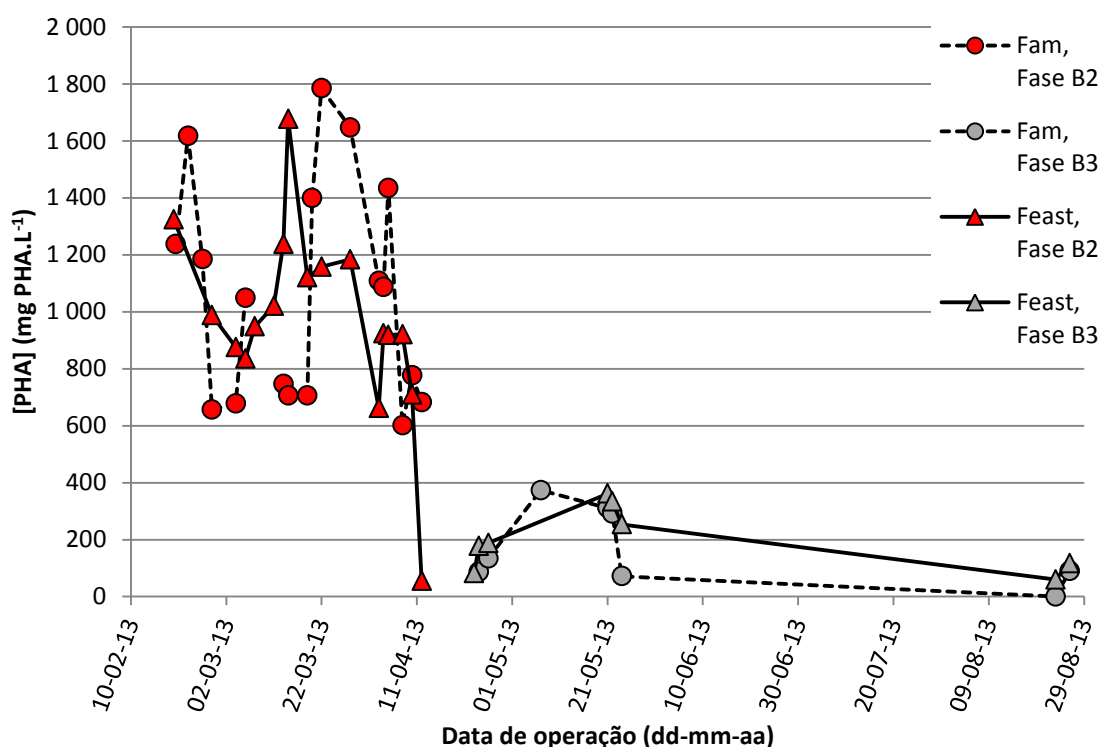


Figura 4.14. Evolução da concentração volumétrica de PHA (em mg PHA.L⁻¹) da fase *famine* e da fase *feast* ao longo da fase B2 e B3.

Uma vez que tem em conta a concentração de SST, a concentração volumétrica de PHA é útil para avaliar a capacidade de produção deste polímero de reserva por parte do sistema. Na fase B2, a concentração de PHA é geralmente superior, atingindo-se um máximo de 1785,07 mg PHA.L⁻¹ na fase *famine* do dia 19 de Março. No início da monitorização na fase B2, existe um decréscimo acentuado desta concentração, devido ao facto de se ter diluído o licor misto do reator, diminuindo a

concentração de sólidos em cerca de um terço, pelo que a biomassa disponível para armazenar PHA também sofreu uma redução drástica. Posteriormente, com a recuperação da concentração de SSV no reator e com o aumento da concentração mássica de PHA, a concentração volumétrica voltou a subir. No final da fase B2, a concentração volumétrica de PHA voltou a decrescer motivada pela diminuição da concentração de SST e consequentemente de SSV, devido aos problemas de sedimentação que afetaram o sistema nesse período, havendo menos biomassa para formar PHA, e pela redução do conteúdo celular de PHA, discutida anteriormente. Na fase B3, os valores da concentração volumétrica de PHA não tiveram alterações muito significativas, um pouco de encontro com o que acontece com a concentração de SST (e de SSV) no mesmo período. Relativamente à fase *feast*, o valor máximo de concentração de PHA no reator foi de $1676,72 \text{ mg PHA.L}^{-1}$, no mesmo dia do máximo registado na fase *famine*, enquanto que o valor mínimo foi apenas de $54,82 \text{ mg PHA.L}^{-1}$, no dia 17 de Abril.

4.3. Aquisição e análise de imagem

A aquisição e a análise das imagens foram processos fundamentais na obtenção dos parâmetros necessários para efetuar a previsão da concentração de PHA numa dada amostra de licor misto, no corrente trabalho. O modo como estas são adquiridas influencia, em última análise, a quantidade de polímero de reserva detetado numa amostra. Existem vários fatores que podem influenciar a quantificação, como as características morfológicas e fisiológicas da biomassa, a concentração da solução de fluorocromo, a presença de outras substâncias lipídicas que também sejam coradas pelo *Nile Blue*, a intensidade da luz de fluorescência emitida, o tempo de exposição da amostra à luz de fluorescência e o tempo de aquisição da imagem, entre outros.

As características morfológicas e fisiológicas da biomassa são um importante fator a ter em conta na metodologia estudada. Como se sabe a produção de PHA está muitas vezes associada a bactérias formadoras de flocos. Por vezes, esses flocos atingem elevadas dimensões (macroflocos) ou são extraordinariamente densos. Este tipo de estruturas pode ocultar grânulos de PHA durante a aquisição das imagens, fazendo com que a quantidade de PHA presente seja subestimada (Mesquita et al., 2013). Para minimizar erros é fundamental que a fragmentação dos flocos de maiores dimensões seja efetuada. Assim, é possível diminuir os efeitos negativos provocados pela sobreposição dos grânulos de PHA aquando do processo de aquisição das imagens. Outra consideração que deve ser acautelada é o facto de ser observada a área projetada do grânulo de PHA em vez do volume para efeitos de quantificação de PHA. Como os grânulos são estruturas tridimensionais, considerar apenas parâmetros dependentes da área projetada (parâmetro bidimensional) é um erro inerente à metodologia utilizada, embora se possa minimizar esse erro considerando os grânulos isolados como estruturas aproximadamente esféricas e efetuando a respetiva transposição para um volume estimado.

A presença de substâncias lipídicas que não polihidroxialcanoatos nas amostras de licor misto é outro fator limitativo do processo, uma vez que estas substâncias, quando coradas com o fluorocromo *Nile Blue*, têm um comportamento que em alguns casos pode ser relativamente semelhante ao PHA na metodologia utilizada. Assim, no processo de análise de imagem, algumas destas substâncias poderão ser identificadas e quantificadas como PHA, o que diminui a precisão do método.

Na Figura 4.15 (c), apesar de aparentemente a biomassa se encontrar bem fragmentada e de se conseguir distinguir os grânulos de PHA, como se observa na Figura 4.15 (a), é possível verificar que a identificação dos grânulos de PHA e a delimitação das áreas dos mesmos não é perfeita, devido à elevada sobreposição entre grânulos, pelo que a quantificação de PHA pode não ser totalmente exata.

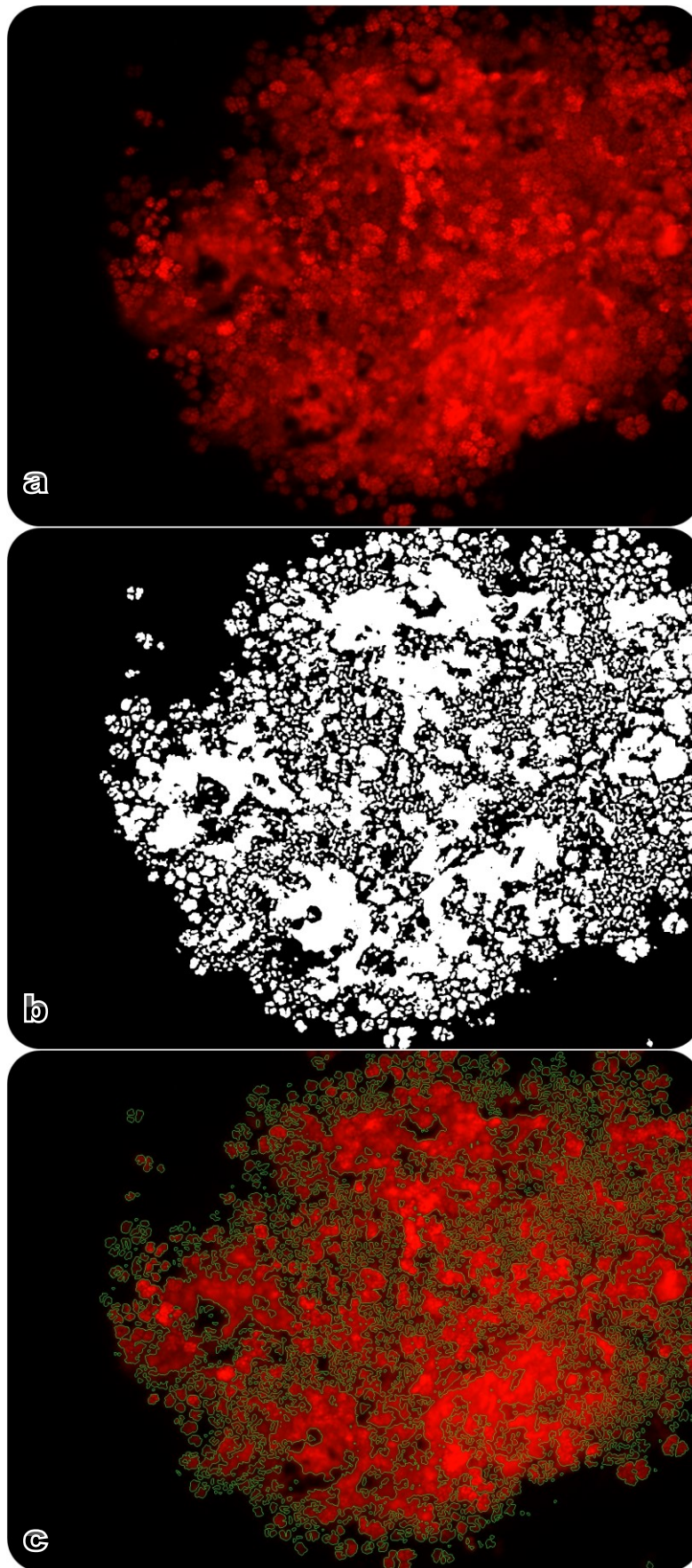


Figura 4.15. Imagens obtidas através do procedimento de coloração de fluorescência *Nile Blue* com a ampliação de 400x. (a) Imagem original. (b) Imagem binária com identificação do PHA. (c) Imagem com identificação das inclusões de PHA evidenciada a verde.

4.4. Análise estatística multivariável

Para atingir o objetivo principal desta tese, comprovar a capacidade da análise de imagens obtidas por microscopia de fluorescência em determinar a concentração de PHA em amostras de licor misto, foram utilizadas ferramentas de estatística multivariável como o método dos mínimos quadrados parciais (PLS). Adicionalmente, para extrair o máximo de informação sobre as dinâmicas do licor misto no SBR, foram também aplicadas outras ferramentas estatísticas como a análise dos componentes principais (ACP).

4.4.1. Previsão da concentração de PHA por PLS

O método dos mínimos quadrados parciais (PLS) é um método de estatística multivariável que se baseia na construção de modelos de previsão em situações em que as variáveis são de elevado número e apresentam bastante colinearidade. Ao contrário da ACP, este método não se foca em perceber as correlações subjacentes entre as variáveis, mas sim em elaborar modelos de resposta que possam prever o comportamento dessas variáveis. Neste trabalho experimental, o método PLS foi aplicado para prever a concentração mássica e volumétrica de PHA através dos dados obtidos por análise de imagem. Para construir essa previsão foi utilizado o *software Matlab 7.3 (Mathworks, E.U.A.)*.

A Tabela 4.2 apresenta os 12 parâmetros decorrentes da análise de imagem utilizados como variáveis preditoras no método de PLS com intuito de prever a concentração de PHA. São também apresentadas as duas concentrações de PHA, a mássica e a volumétrica, que servem como variáveis resposta, fundamentais nesta abordagem do método PLS. Essa abordagem baseia-se na construção de um modelo para um certo número de variáveis a partir de um conjunto de dados e no seu posterior teste noutro conjunto de dados, escolhendo o número de variáveis extraídas para o qual o erro total de previsão é mais reduzido.

Neste método foram estudadas 6 variáveis latentes (LVs), metade do número de variáveis de previsão da matriz X. Este número foi significativamente inferior ao número de amostras usadas nas variáveis resposta (matriz Y), o que é importante para a validação do método.

Tabela 4.2. Variáveis provenientes da análise de imagem usadas no método de PLS para prever a concentração de PHA.

Parâmetro	Simbologia da variável	Variável	Unidades
Preditor (X)	Val_org	Intensidade total da imagem original	Adimensional
	Val_sbk	Intensidade total da imagem com correção do <i>background</i>	Adimensional
	Area_gran	Área total dos grânulos de PHA por imagem	Pixéis
	Total_gran1	Intensidade total dos grânulos de PHA determinada da imagem original	Adimensional
	Media_gran1	Intensidade média dos grânulos de PHA calculada da imagem original	Adimensional
	Total_gran2	Intensidade total dos grânulos de PHA determinada da imagem com correção do <i>background</i>	Adimensional
	Media_gran2	Intensidade média dos grânulos de PHA calculada da imagem com correção do <i>background</i>	Adimensional
	f_area_gran	Área total dos grânulos de PHA por imagem com fator de correção volumétrico	Pixéis
	f_total_gran1	Intensidade total dos grânulos de PHA determinada da imagem original com fator de correção volumétrico	Adimensional
	f_med_gran1	Intensidade média dos grânulos de PHA calculada da imagem original com correção de truncatura	Adimensional
	f_total_gran2	Intensidade total dos grânulos de PHA determinada da imagem com correção do <i>background</i> e com fator de correção volumétrico	Adimensional
	f_med_gran2	Intensidade média dos grânulos de PHA calculada da imagem com correção do <i>background</i> e com correção de truncatura	Adimensional
Resposta (Y)	[PHA]	Concentração mássica de PHA	mg PHA/mg SST
	[PHA]'	Concentração volumétrica de PHA	mg PHA/L

A quantificação do PHA a partir da análise de imagem apresenta uma limitação já abordada no subcapítulo 4.3 de não ter em consideração a tridimensionalidade dos grânulos de PHA, contabilizando apenas parâmetros dependentes da área projetada (bidimensional). Para a quantificação ser o mais precisa possível, é então necessário aproximar o espaço bidimensional das imagens à realidade das três dimensões dos grânulos. Para reduzir os erros desta aproximação ao espaço tridimensional, foram efetuadas transformações a alguns parâmetros da análise de imagem. Nos parâmetros absolutos (totais) respeitantes aos grânulos de PHA (Area_gran, Total_gran1 e Total_gran2), e que por isso estão sujeitos ao erro de aproximação de uma área projetada a duas dimensões a um volume (a três dimensões), foi aplicado um fator corretivo (fator de correção

volumétrico) de $x^{3/2}$ que permite transformar as áreas projetadas em volumes, para geometrias aproximadamente esféricas. O resultado dessa correção é representado pelas seguintes variáveis preditoras presentes na Tabela 4.2: f_area_gran , f_total_gran1 e f_total_gran2 . Já nos parâmetros de intensidade média ($Media_gran1$ e $Media_gran2$) foi aplicada uma correção de truncatura, que se baseia na subtração do valor mínimo na escala de intensidades a partir da qual o programa identifica o PHA. Ambas as correções foram executadas nos parâmetros provenientes tanto das imagens originais como das imagens com correção de *background*.

Foram ainda retiradas as amostras com concentrações de PHA muito baixas (menores que 50 mg PHA/L), devido ao limite de detecção desta técnica, e muito elevadas (maiores que 0,4 mg PHA/mg SST ou 1800 mg PHA/L), reduzindo assim possíveis efeitos de *photo bleaching* que eventualmente tenham ocorrido na aquisição das imagens. Esses valores consideram-se fora da gama de valores aplicáveis nesta metodologia de análise de imagem. Deste modo, fora desta gama poderá haver a necessidade de efetuar alterações na metodologia de aquisição das imagens, como mudanças no tempo de exposição, concentração de corante, etc.

Na Figura 4.16 podem-se verificar os resultados do método PLS efetuado com a variável resposta concentração mássica de PHA, sem aplicar a correção de truncatura pela eliminação das amostras fora da gama de valores aplicável.

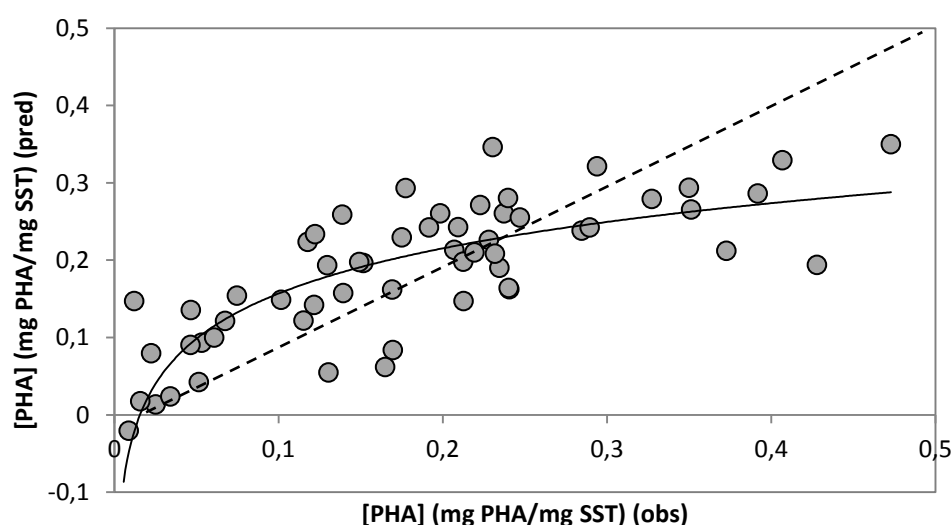


Figura 4.16. Resultados do método PLS. Concentração mássica de PHA observada (em mg PHA/mg SST) vs. concentração mássica de PHA predita pelo método (em mg PHA/mg SST).

Na Figura 4.17 podem-se verificar os resultados do método PLS efetuado com a variável resposta concentração volumétrica de PHA, sem aplicar a correção de truncatura pela eliminação das amostras fora da gama de valores aplicável.

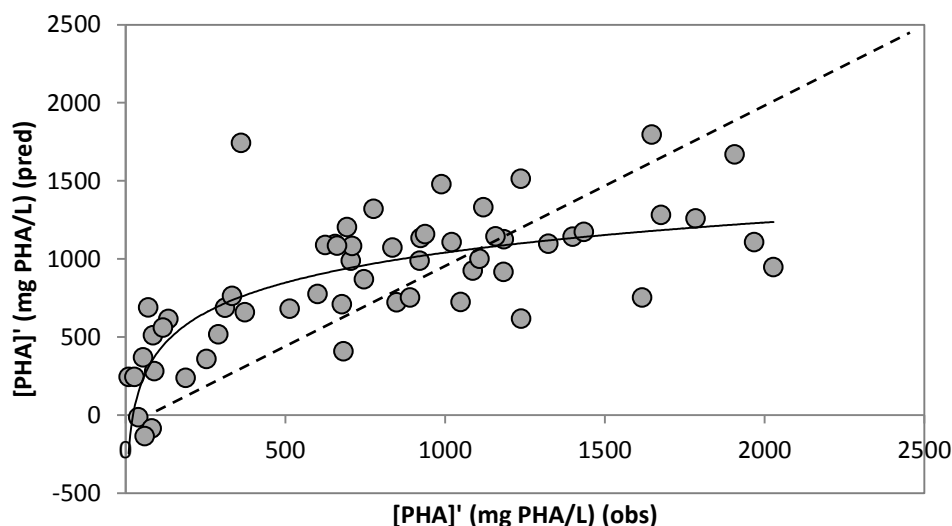


Figura 4.17. Resultados do método PLS. Concentração volumétrica de PHA observada (em mg PHA/L) vs. concentração volumétrica de PHA predita pelo método (em mg PHA/L).

Nesta análise foram efetuados dois estudos com os resultados provenientes do método PLS. Um primeiro estudo considerou todos os valores das fases *feast* e *famine* conjuntamente. Já no segundo estudo, os valores relativos às amostras da fase *feast* e da fase *famine* foram divididos em dois conjuntos independentes. O objetivo é identificar qual dos métodos faria uma melhor previsão da concentração de PHA.

A Figura 4.18 e a Figura 4.19 apresentam os resultados da regressão linear resultante do método de previsão PLS com as concentrações mássicas (Figura 4.18) e as concentrações volumétricas (Figura 4.19) de PHA, considerando conjuntamente todos os valores das fases *famine* e *feast*. Analisando os baixos valores do coeficiente de correlação obtidos (R^2 de 0.601 e 0.511, respetivamente, para a concentração mássica e volumétrica de PHA), pode-se verificar que a utilização conjunta dos dados de *feast* e *famine* não parece dar origem a boas capacidades de predição.

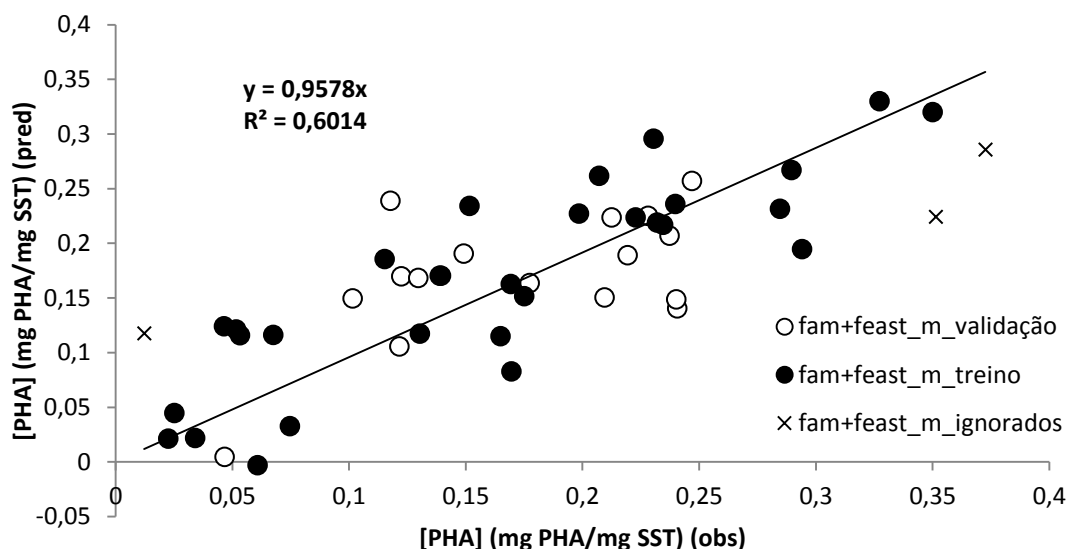


Figura 4.18. Regressão linear do modelo resultante do método de previsão PLS com as concentrações mássicas de PHA, com utilização de todos valores da fase *famine* e da fase *feast* conjuntamente. Os pontos com (x) foram desprezados.

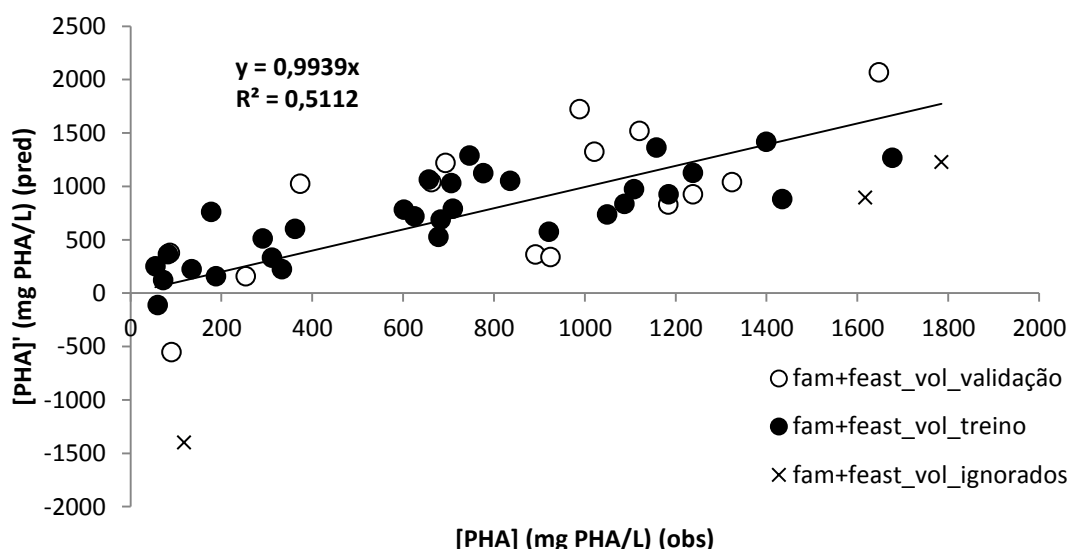


Figura 4.19. Regressão linear do modelo resultante do método de previsão PLS com as concentrações mássicas de PHA, com utilização de todos valores da fase *famine* e da fase *feast* conjuntamente. Os pontos com (x) foram desprezados.

A Figura 4.20 apresenta os resultados dos modelos PLS efetuados para prever a concentração mássica de PHA com a utilização de 27 amostras da fase *famine* e de 23 amostras da fase *feast* de forma independente. As amostras foram separadas aleatoriamente em conjuntos de treino, em que cerca de dois terços das amostras de cada fase foram utilizadas para calibrar o modelo, e conjuntos de validação, em que cerca de um terço das amostras foram utilizadas para validar o modelo. Como se pode verificar na Figura 4.20, dois valores (fam+feast_m_ignorados) foram excluídos do modelo de previsão já que se afastavam bastante da tendência geral. Da regressão linear resultou um coeficiente de regressão R^2 de aproximadamente 0,80, o que representa um ajuste relativamente satisfatório, tanto mais que se trata de uma metodologia ainda em desenvolvimento.

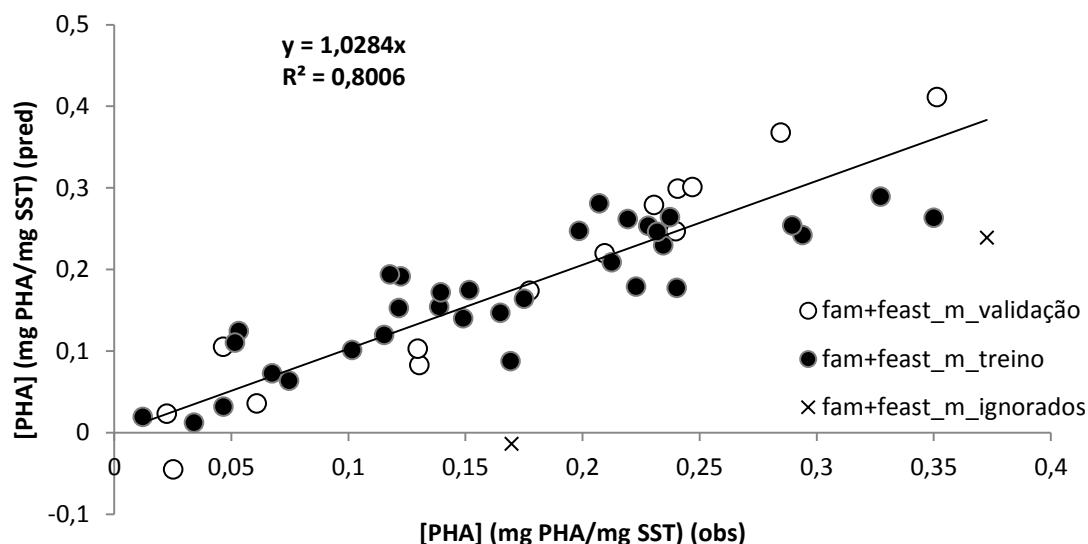


Figura 4.20. Regressão linear do modelo resultante do método de previsão PLS com as concentrações mássicas de PHA, com utilização dos valores da fase *famine* e da fase *feast* independentemente. Os pontos com (x) foram desprezados.

A Figura 4.21 apresenta os resultados dos modelos PLS efetuados para prever a concentração volumétrica de PHA com a utilização das amostras da fase *famine* e da fase *feast* independentemente. Tal como anteriormente, as amostras foram separadas aleatoriamente em conjuntos de treino (dois terços) e de validação (um terço). Neste modelo de previsão, foi excluído apenas um valor (fam+feast_m_ignorados). Da regressão linear, apresentada na Figura 4.21, resulta um coeficiente de regressão (R^2 de aproximadamente 0,72) um pouco inferior ao anterior, pelo que este modelo terá menor capacidade de previsão do que o usado para prever a concentração mássica de PHA. Esta menor capacidade de previsão poderá dever-se ainda à metodologia de cálculo desta concentração. De facto, a concentração volumétrica de PHA é calculada a partir da concentração mássica de PHA e da concentração de sólidos suspensos totais. Ao introduzir uma nova variável (com um determinado erro associado) no cálculo, aumenta a variabilidade na resposta e, portanto, aumenta a dificuldade do modelo em prever esta concentração de PHA de forma mais eficaz.

Verifica-se, assim, que a utilização de forma independente dos dados referentes à fase *feast* e à fase *famine*, para a modelação das concentrações de PHA, aumentou de forma significativa o poder preditivo desta metodologia. A explicação para este facto poderá residir na ocorrência de algum tipo de modificação estrutural das células, ou dos grânulos de PHA, após a fase de *starvation* (consequência da ausência total de fonte de carbono), o que poderá ter consequências na resposta dos mesmos ao processo de coloração ou à reação à fluorescência. Deste modo, a avaliação da concentração de PHA dependeria de modelos preditivos diferentes consoante se tratasse da fase *feast* ou da fase *famine*.

Apesar dos coeficientes de regressão resultantes do ajuste dos modelos de previsão da concentração mássica e volumétrica de PHA não terem sido muito elevados, houve uma melhoria significativa em relação ao R^2 máximo obtido por Mesquita, et al. (2013) de 0,65 para o modelo de previsão da concentração de PHA, ainda que com um conjunto de dados menos vasto. Desta forma

comprova-se o sucesso das correções de truncatura e de minimização do erro motivado pela bidimensionalidade dos parâmetros de análise de imagem efetuadas às variáveis de previsão, uma vez que essas retificações não foram aplicadas nesse estudo anterior. Desta forma, ainda não é possível prever com exatidão a concentração de PHA de uma amostra de licor misto a partir da metodologia de análise de imagem utilizada. Contudo, apesar desta metodologia de quantificação de PHA necessitar de ser otimizada, até por consequência de todas as limitações referidas anteriormente, os resultados disponíveis até ao momento indicam que se trata de uma metodologia promissora.

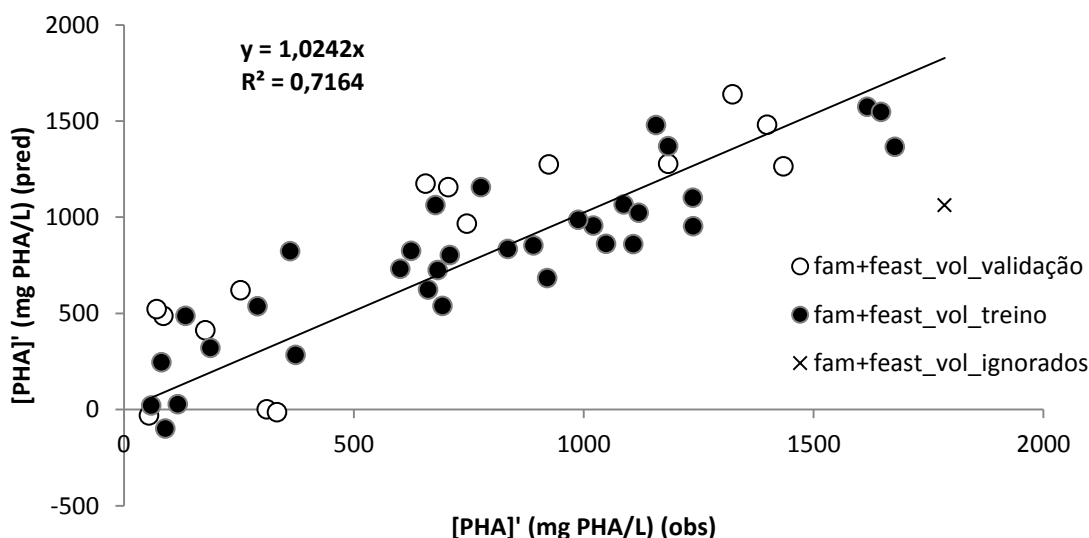


Figura 4.21. Regressão linear do modelo resultante do método de previsão PLS com as concentrações volumétricas de PHA, com utilização dos valores da fase *famine* e da fase *feast* independentemente. Os pontos com (×) foram desprezados.

Na Figura 4.22 e na Figura 4.23 apresenta-se o ajustamento dos valores resultantes do modelo de previsão baseado no método de PLS para a concentração mássica de PHA na fase *famine* e *feast*, respetivamente, face aos valores experimentais efetivamente observados. A partir destas figuras confirma-se o bom ajuste desta técnica já demonstrado anteriormente e verifica-se a possibilidade de prever a concentração mássica de PHA com alguma exatidão.

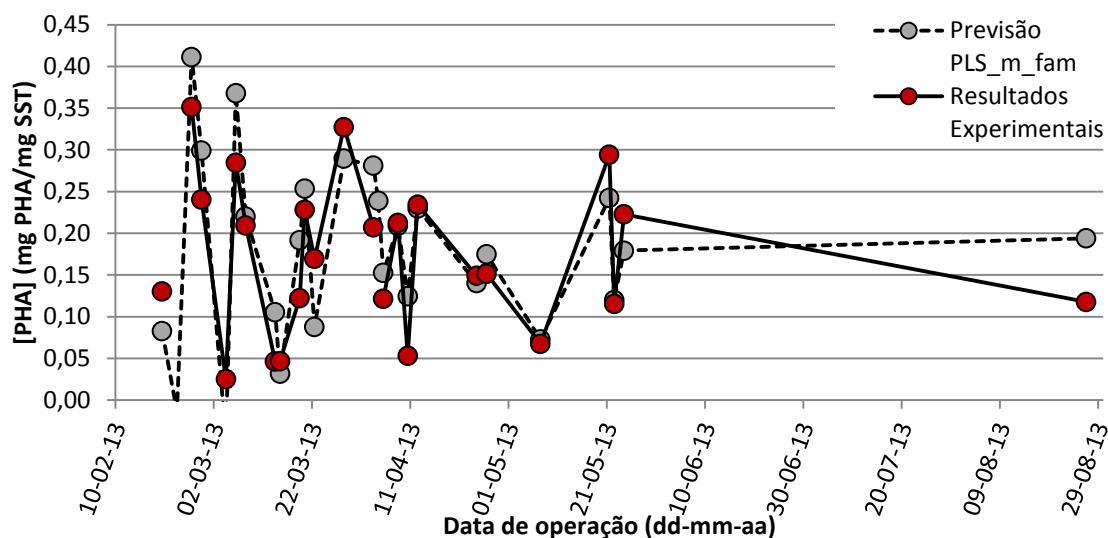


Figura 4.22. Previsão da concentração mássica de PHA na fase *famine* a partir do método de PLS. Comparação com os resultados experimentais observados.

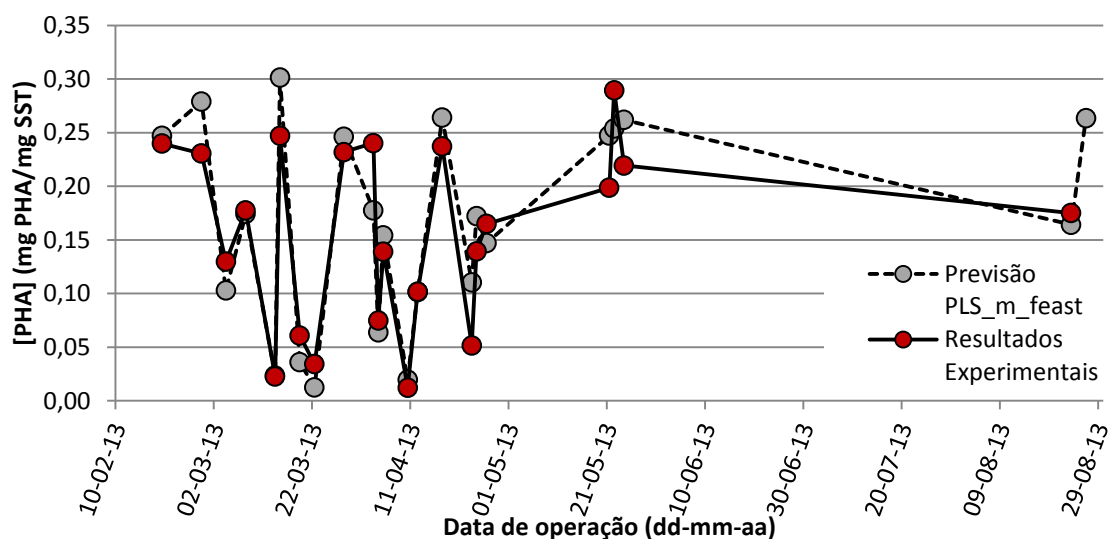


Figura 4.23. Previsão da concentração mássica de PHA na fase *feast* a partir do método de PLS. Comparação com os resultados experimentais observados.

A Figura 4.24 e a Figura 4.25 apresentam o ajustamento dos valores decorrentes do modelo de previsão baseado no método de PLS para a concentração volumétrica de PHA na fase *famine* e *feast*, respetivamente, face aos valores experimentais efetivamente observados. Efetuando uma análise visual, é possível verificar que a previsão feita a partir das concentrações mássicas de PHA é mais exata, confirmando a análise efetuada anteriormente.

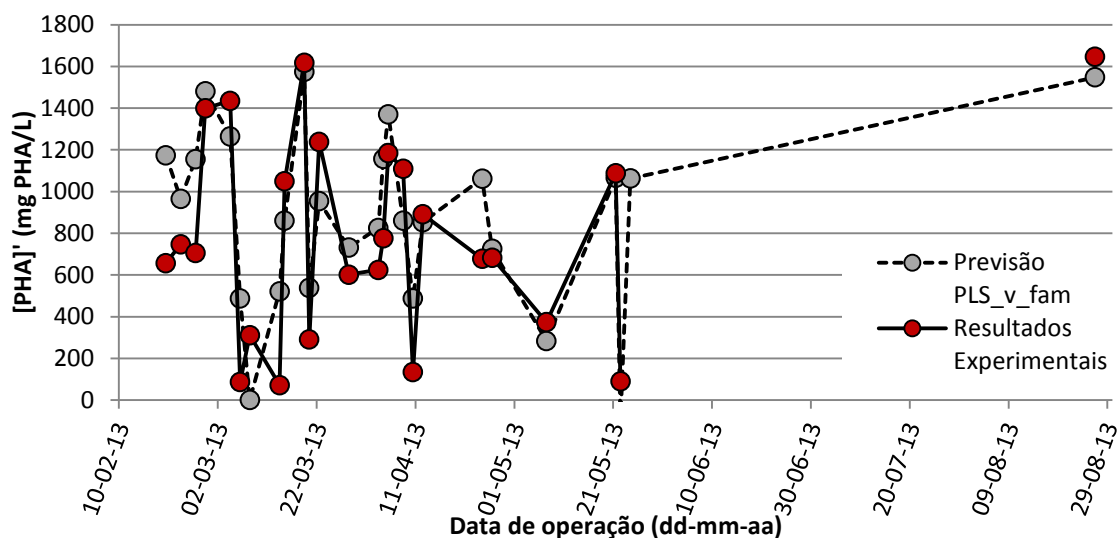


Figura 4.24. Previsão da concentração volumétrica de PHA na fase *famine* a partir do método de PLS. Comparação com os resultados experimentais observados.

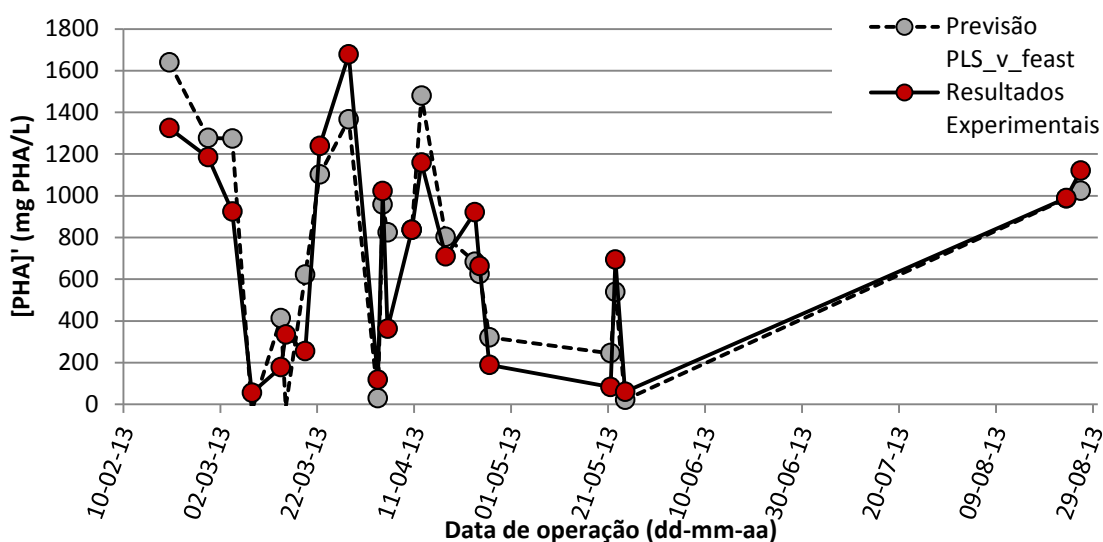


Figura 4.25. Previsão da concentração volumétrica de PHA na fase *feast* a partir do método de PLS. Comparação com os resultados experimentais observados.

4.4.2. Análise conjunta dos resultados por ACP e MLRA

Com vista a avaliar de que forma o desempenho do SBR se correlaciona com a produção de PHA e com os resultados provenientes da análise de imagem, estendeu-se a análise multivariável dos parâmetros de análise de imagem e concentrações de PHA também aos parâmetros físico-químicos do reator.

O objetivo da análise dos componentes principais (ACP) é transpor um elevado número de variáveis para um número mais reduzido de componentes dependentes dessas variáveis. Assim, é também possível identificar possíveis padrões de intercorrelação e colinearidade entre variáveis (Friel, 2010). Para efetuar esta análise recorreu-se ao *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences* – IBM, E.U.A.).

Tabela 4.3. Variáveis provenientes da análise de imagem e das determinações físico-químicas utilizadas na análise dos componentes principais.

Simbologia da variável	Variável	Unidades
Val_sbk_fam	Intensidade total da imagem com correção do <i>background</i> nas amostras da fase <i>famine</i>	Adimensional
Val_sbk_feast	Intensidade total da imagem com correção do <i>background</i> nas amostras da fase <i>feast</i>	Adimensional
Area_gran_fam	Área total dos grânulos de PHA por imagem nas amostras da fase <i>famine</i>	Pixéis
Area_gran_feast	Área total dos grânulos de PHA por imagem nas amostras da fase <i>feast</i>	Pixéis
Total_gran2_fam	Intensidade total dos grânulos de PHA determinada da imagem com correção do <i>background</i> nas amostras da fase <i>famine</i>	Adimensional
Total_gran2_feast	Intensidade total dos grânulos de PHA determinada da imagem com correção do <i>background</i> nas amostras da fase <i>feast</i>	Adimensional
Media_gran2_fam	Intensidade média dos grânulos de PHA calculada da imagem com correção do <i>background</i> nas amostras da fase <i>famine</i>	Adimensional
Media_gran2_feast	Intensidade média dos grânulos de PHA calculada da imagem com correção do <i>background</i> nas amostras da fase <i>feast</i>	Adimensional
[PHA]_med	Média das concentrações mássicas de PHA das amostras da fase <i>famine</i> com as amostras da fase <i>feast</i>	mg PHA/mg SST
[SST]	Concentração de sólidos suspensos totais das amostras de licor misto	mg SST/L
IVL	Índice volumétrico de lamas do licor misto	mL/g SST
CQO_licor	Carência química de oxigénio das amostras de licor misto	mg O ₂ /L
CQO_SN	Carência química de oxigénio das amostras de sobrenadante	mg O ₂ /L
[TC]	Concentração de carbono total das amostras de sobrenadante	mg TC/L
[TN]	Concentração de azoto total das amostras de sobrenadante	mg TN/L

Os valores utilizados nesta análise correspondem às amostras da monitorização da concentração de PHA, apresentadas no subcapítulo 4.2, durante as fases B2 e B3, perfazendo um total de 58 amostras. A Tabela 4.3 apresenta as 15 variáveis utilizadas nesta análise. Foram utilizadas variáveis provenientes tanto da análise de imagem, como os valores de intensidade total, dos grânulos de PHA e da imagem, e da área total dos grânulos de PHA, como das análises físico-químicas efetuadas, como a CQO, o IVL, os SST, os SSV e a determinação de PHA por GC-FID. Os valores das amostras da fase *famine* e da fase *feast* foram considerados em separado para esta análise, à exceção da variável [PHA]_med, que retrata a média das concentrações mássicas de PHA das amostras das

duas fases. Como se pode verificar o número de amostras é relativamente reduzido face ao número de variáveis tidas em conta. Esta é de fato uma limitação deste estudo, constatada pela aplicação do teste de Kaiser-Meyer-Olkin, que permite inferir a adequabilidade da aplicação das técnicas estatísticas ao conjunto de amostras, cujo resultado foi de 0,627. A partir deste valor pode-se aferir que a adequabilidade da ACP às variáveis consideradas é medíocre (Friel, 2010). Para reduzir os efeitos dessa limitação, não foram introduzidas na ACP todas as variáveis consideradas no método de previsão por PLS, considerando-se apenas as variáveis com correção de *background*, nem a variável dos sólidos suspensos voláteis, uma vez que, neste trabalho, apresenta uma correlação ótima com a concentração de sólidos suspensos totais (ver subcapítulo 4.1).

Tabela 4.4. Matriz de componentes rodada (5 componentes principais). Método de extração: análise de componentes principais. Método de rotação: Varimax com normalização de Kaiser. A rotação convergiu em 6 iterações.

Variável	Componente					Comunalidade
	1	2	3	4	5	
Val_sbk_fam		0,985				0,979
Val_sbk_feast			0,974			0,969
Area_gran_fam		0,948				0,955
Area_gran_feast			0,931			0,908
Total_gran2_fam		0,872		0,454		0,983
Total_gran2_feast			0,808	0,515		0,950
Media_gran2_fam				0,852		0,888
Media_gran2_feast				0,803		0,855
[PHA]_med				0,686	-0,458	0,719
[SST]	0,957					0,925
IVL	-0,837					0,833
CQO_licor	0,953					0,922
CQO_SN					0,722	0,835
[TC]					0,811	0,825
[TN]	0,488				0,757	0,876
Valores próprios	3,08	2,93	2,87	2,50	2,04	13,42
% da variância total explicada	18,1%	17,3%	16,9%	14,7%	12,0%	89,5%

Nota: Apenas se apresentam os *factor loadings* superiores a 0,4, sendo que os mais significativos, com módulo superior a 0,6, se encontram a negrito.

Analisando os resultados da análise de componentes principais, presentes na matriz de componentes rodada da Tabela 4.4, observa-se que se reduziram as 15 variáveis a 5 componentes e que essas cinco componentes conseguem explicar 89,5% da variância demonstrada por todas as variáveis utilizadas neste método. Caso o método seja realizado com quatro componentes, a percentagem cumulativa da variância total explicada diminui (resultados não apresentados), pelo que

a ACP com cinco componentes é mais representativa das variáveis consideradas. Outra razão para escolher a ACP com cinco componentes passa pela constatação de que todas as cinco componentes explicam mais variância do que uma única variável, já que todos os valores próprios são superiores à unidade. À exceção de [PHA]_med, todas as variáveis têm a sua variância bem representada nas cinco componentes resultantes do método, já que as suas comunalidades são superiores a 0,80. Ainda assim, a variável [PHA]_med apresenta um valor da proporção de variância explicada pelas cinco componentes consideradas bastante razoável, com uma comunalidade acima de 0,7.

Analisando os *factor loadings* de cada componente, é possível verificar que a concentração de sólidos suspensos totais ([SST]), o índice volumétrico de lamas (IVL) e a carência química de oxigénio do licor misto (CQO_licor) encontram-se fortemente correlacionadas na componente 1, sendo que os valores de IVL correlacionam-se negativamente com as restantes variáveis, pelo que este parâmetro decresce com o aumento da concentração de sólidos (SST) e de CQO. Sendo estas variáveis relativas ao licor misto, a componente 1 está indubitavelmente associada às características físico-químicas do mesmo. De salientar ainda a razoável correlação da concentração de azoto total no sobrenadante ([TN]) nesta componente. O facto, discutido anteriormente neste capítulo, da concentração de TN da alimentação ter diminuído ao longo do tempo levando a uma menor [TN] à saída e a coincidência de os SST terem diminuído, poderá justificar esta “correlação”, que não está necessariamente ligada à correlação entre os SST e a concentração de azoto total, que seria de todo inesperada.

Na componente 2, as variáveis Val_sbk_fam, Area_gran_fam e Total_gran2_fam estão fortemente correlacionadas. Estes parâmetros provêm da análise às imagens das amostras da fase *famine*, pelo que se pode referir que esta componente está associada à identificação de zonas com PHA nas amostras da fase *famine* no âmbito do procedimento de análise das imagens. Já para a componente 3, as variáveis correspondentes às características anteriores mas relativas à fase *feast*, encontram-se fortemente correlacionadas. Desta forma, os parâmetros Val_sbk_feast, Area_gran_feast e Total_gran2_feast são resultantes da análise às imagens das amostras da fase *feast*, o que significa que esta componente está associada à identificação de zonas com PHA nas amostras da fase *feast*. Estes parâmetros estão interligados uma vez que resultam da intensidade total de PHA, da intensidade total dos grânulos de PHA na imagem ou da área dos grânulos de PHA numa dada imagem. Por exemplo, se a área de grânulos de PHA numa imagem aumentar, aumentará também a intensidade total dos grânulos e a intensidade total de PHA nessa imagem (para uma mesma intensidade média dos grânulos). De referir que nenhuma das variáveis pertencentes às amostras da fase *feast* apresenta uma correlação relevante com alguma das variáveis referentes às amostras da fase *famine*, pelo que se pode concluir que esta análise permite diferenciar claramente entre os resultados da análise de imagem nas duas fases.

Na componente 4, a média das concentrações de PHA nas amostras da fase *famine* e da fase *feast* ([PHA]_med) e as intensidades médias dos grânulos de PHA nas amostras da fase *feast* e das amostras fase *famine* (Media_gran2_fam e Media_gran2_feast, respetivamente) encontram-se correlacionadas, pelo que quando estas intensidades médias aumentam, também a concentração de PHA parece aumentar. Este parâmetro resultante da análise de imagem é distinto dos outros, uma

vez que a intensidade medida é média e não total. Este fato poderá explicar a razão da Media_gran2_fam e da Media_gran2_feast se correlacionarem tão bem com a concentração mássica de PHA (mg PHA por mg SST), ao contrário dos outros parâmetros provenientes da análise de imagem.

Por fim, a componente 5 está associada às características físico-químicas do sobrenadante, uma vez que a carência química de oxigénio do sobrenadante (CQO_SN) e as concentrações de carbono e azoto total no sobrenadante ([TC] e [TN], respetivamente) estão bem correlacionadas nesta componente. Esta boa correlação significa que, por exemplo, uma subida da CQO do sobrenadante implica uma subida nas concentrações de carbono total e de azoto total no mesmo e uma diminuição geral na qualidade do sobrenadante. Seria expectável que assim acontecesse no caso da CQO e do TC, uma vez que a carga orgânica oxidável quimicamente é, não poucas vezes, dependente da concentração em compostos ricos em carbono. Verifica-se, ainda, que uma maior qualidade do sobrenadante, com valores de CQO, TC e TN mais baixos, está correlacionada com maiores concentrações de PHA, já que, ainda que de forma pouco vincada, [PHA]_med está inversamente correlacionada com as variáveis CQO_SN, [TC] e [TN]. Ou seja, valores de concentração de PHA mais elevados parecem ocorrer com menores concentrações de substrato no efluente de saída do reator, e, conseqüentemente, maiores percentagens de eficácia de tratamento da matéria orgânica afluente. A partir destes dados, pode-se aferir que uma maior captação de nutrientes (como o carbono ou o azoto) por parte da população microbiana resulta numa maior produção/acumulação de compostos de reserva, entre os quais, o PHA, pelo que comprova-se, em certa medida, a capacidade de tratamento dos sistemas de produção de PHA.

A análise de regressão linear multivariada (MLRA) é uma técnica de estatística multivariável que tem por objetivo principal determinar o melhor conjunto de parâmetros, a fim de o modelo constituído por esses parâmetros prever da forma mais precisa quanto possível os valores experimentais resultantes de uma variável dependente (Y). Também é útil para perceber se esse modelo é adequado para se ajustar aos dados experimentais observados.

Com vista a averiguar a possibilidade de previsão da concentração de PHA na biomassa, efetuou-se a MLRA utilizando, como variáveis independentes (preditores), os *factor scores* resultantes da análise de componentes principais realizada anteriormente e, como variável dependente, a média das concentrações mássicas de PHA das amostras da fase *famine* com as amostras da fase *feast* ([PHA]_med). Este estudo foi denominado de “MLRA_5CP”.

Foi efetuada a regressão linear entre o modelo previsto pela MLRA e as médias das concentrações mássicas observadas de PHA (Figura 4.27) com o qual se verificou o ajuste bastante razoável do modelo aos dados experimentais, com um R^2 de 0,7323. Um dos valores de média das concentrações de PHA na fase *famine* e *feast* não foi considerado no modelo uma vez que ultrapassava a gama de valores para os quais esta metodologia é válida, como se comprovou no método PLS no subcapítulo 4.4.1.

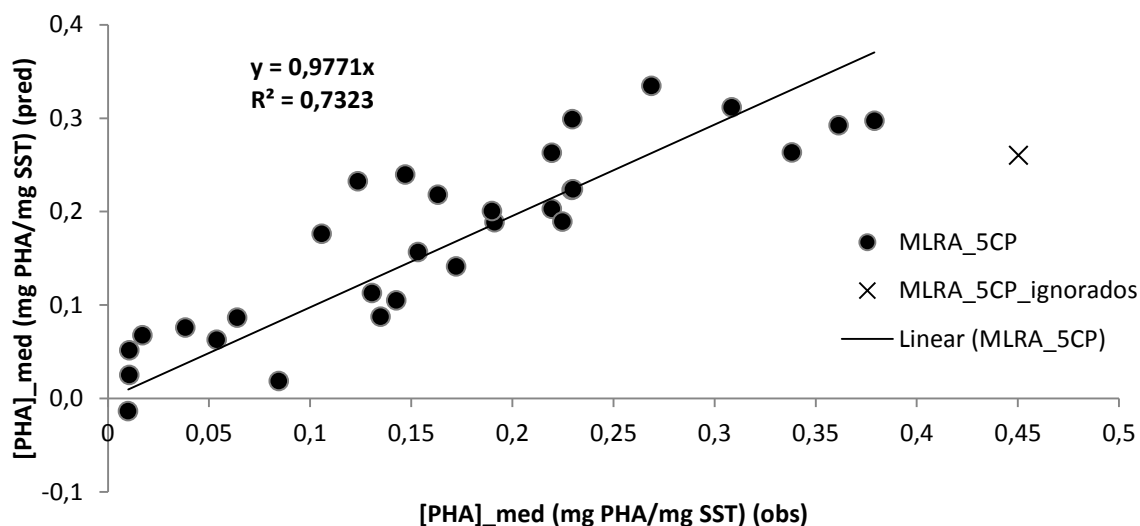


Figura 4.26. Regressão linear do modelo resultante do método de previsão MLRA com as médias das concentrações mássicas de PHA, da fase *famine* e da fase *feast*, e com os *factor scores* provenientes das 5 componentes da ACP. Os pontos com (x) foram desprezados.

A partir da MLRA, confirmou-se que os resultados preditos se ajustam bastante satisfatoriamente à concentração mássica média observada de PHA nas amostras da fase *famine* e nas amostras da fase *feast*, conforme se observa na Figura 4.27. O coeficiente de regressão de 0,719 (regressão não apresentada) relativamente ao modelo de previsão atesta também esses resultados.

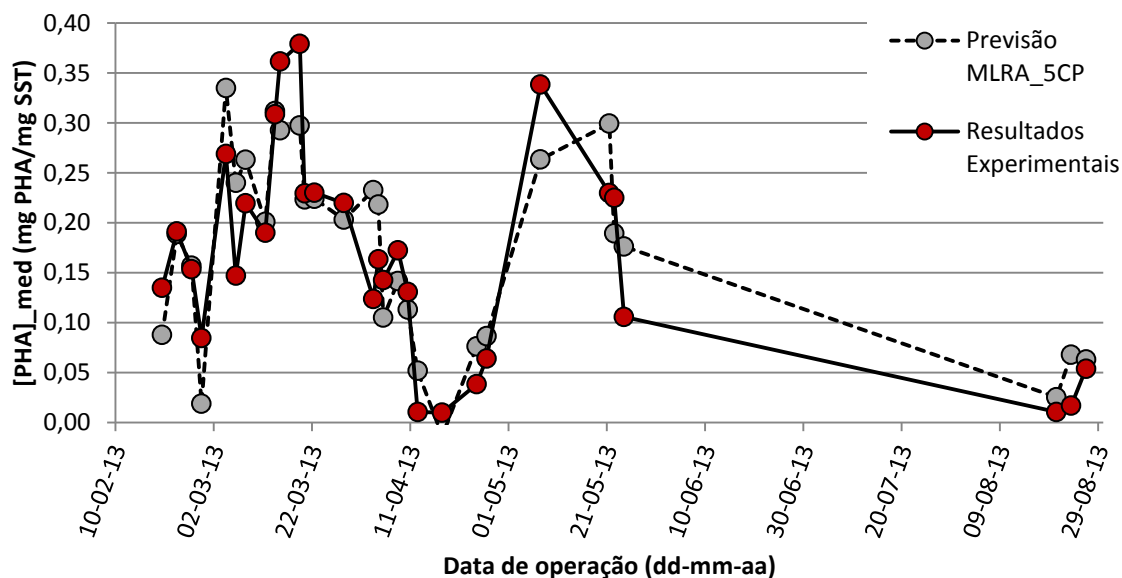


Figura 4.27. Previsão da concentração média de PHA a partir da análise de regressão linear multivariada com os *factor scores* provenientes das 5 componentes da ACP. Comparação com os resultados experimentais observados.

De igual modo interessante é averiguar a possibilidade de, a partir de um conjunto reduzido de variáveis obtidas por análise de imagem e de parâmetros físico-químicos normalmente monitorizados em sistemas de tratamento de efluentes, se poder prever a concentração mássica de PHA no licor misto do reator, o que poderia apresentar um interesse prático óbvio na monitorização da ETAR com vista à otimização da produção de PHA. Para avaliar esta possibilidade nos dados experimentais disponíveis aplicou-se a MLRA às variáveis mais correlacionadas com cada uma das componentes e que se encontram identificadas a sombreado na Tabela 4.4, tendo-se denominado esse estudo de “MLRA_5V”. As variáveis preditoras (X) usadas no referido estudo bem como a variável dependente (Y) são apresentadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Variáveis provenientes da análise de imagem e das determinações físico-químicas usadas no método de MLRA para prever a concentração mássica de PHA.

Parâmetro	Simbologia da variável	Variável	Unidades
Preditor (X)	Val_sbk_fam	Intensidade total da imagem com correção do <i>background</i> nas amostras da fase <i>famine</i>	Adimensional
	Val_sbk_feast	Intensidade total da imagem com correção do <i>background</i> nas amostras da fase <i>feast</i>	Adimensional
	Media_gran2_fam	Intensidade média dos grânulos de PHA calculada da imagem com correção do <i>background</i> nas amostras da fase <i>famine</i>	Adimensional
	[SST]	Concentração de sólidos suspensos totais das amostras de licor misto	mg SST/L
	[TC]	Concentração de carbono total das amostras de sobrenadante	mg TC/L
Variável dependente (Y)	[PHA]_med	Média das concentrações mássicas de PHA das amostras da fase <i>famine</i> com as amostras da fase <i>feast</i>	mg PHA/mg SST

O ajuste do modelo de previsão no estudo “MLRA_5V” não se ajusta tão bem aos dados experimentais face ao “MLRA_5CP”. Neste caso, eliminando apenas a concentração acima de 0,4 mg PHA/mg SST, o coeficiente de regressão fica-se pelos 0,3740. No entanto, eliminando apenas mais 3 pontos desajustados do modelo de regressão, a regressão melhora substancialmente (0,6632) como se pode verificar na Figura 4.28. Assim, verifica-se que se consegue prever com alguma razoabilidade, tendo em conta o número reduzido de parâmetros utilizados, a concentração mássica de PHA no reator apenas a partir de três parâmetros decorrentes da análise de imagem e de dois parâmetro físico-químicos, um caracterizador da concentração de biomassa no reator (SST) e outro das características do efluente tratado (TC), o que demonstra que a análise de imagem pode efetivamente desempenhar um papel relevante na operação e controlo de ETAR com vista à produção de bioplásticos. No entanto, e ao contrário do modelo de previsão encetado pelo método PLS, este método do MLRA não oferece um modelo tão válido, pelo que necessita de maiores transformações a fim de a sua previsão ser mais precisa.

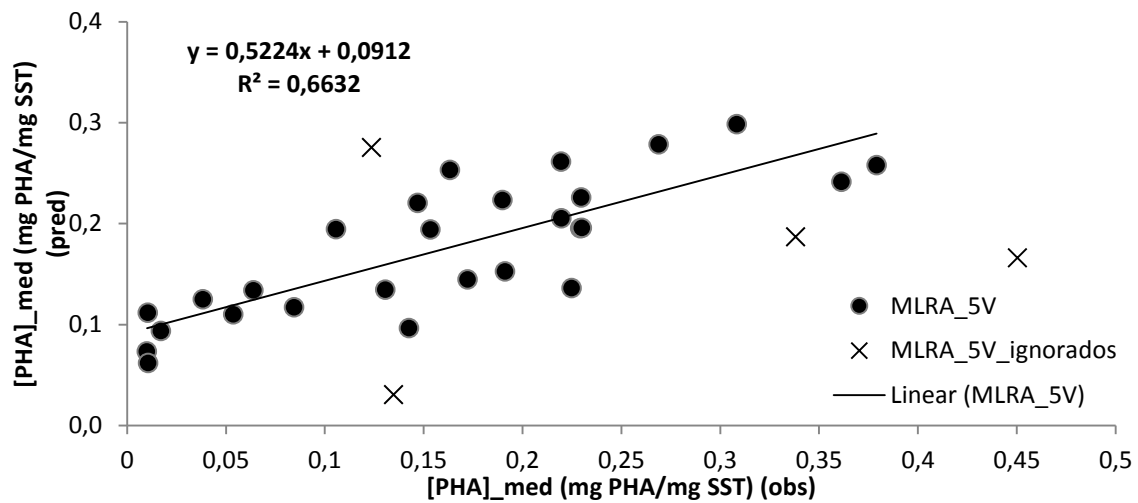


Figura 4.28. Regressão linear do modelo resultante do método de previsão MLRA com as médias das concentrações mássicas de PHA, da fase *famine* e da fase *feast*, e com as variáveis mais correlacionadas com cada uma das 5 componentes da ACP. Os pontos com (×) foram desprezados.

5. CONCLUSÕES

Os PHAs surgem como uma alternativa ambientalmente sustentável, já que conseguem reproduzir grande parte das aplicações dos plásticos ditos normais, tendo as grandes vantagens de serem biodegradáveis e produzidos a partir de uma fonte de carbono renovável. A nível económico essa alternativa não é tão óbvia, no entanto, parece uma questão de tempo até o processo de produção de PHA por lamas ativadas, que parece o mais promissor, ser otimizado para assim reduzir os custos de produção. Adicionalmente será também necessário reduzir os custos de purificação do PHA para o processo ser implementado em larga escala.

Neste trabalho experimental, foi montada uma instalação com um sistema de lamas ativadas num SBR cujo principal objetivo era produzir PHA. Concomitantemente, pretendia-se verificar se o sistema poderia funcionar com um sistema de tratamento de águas residuais aliando assim a função de tratamento de efluentes líquidos com a produção de um produto de valor acrescentado como é o PHA.

Primeiramente, o objetivo de produzir PHA através do regime de alimentação dinâmica aeróbia com uma alimentação com acetato, como principal fonte de carbono, e sem controlo do pH foi conseguido, atingindo-se um máximo de concentração mássica de 0,37 mg PHA/mg SST, que, em termos de concentração celular, corresponde a pelo menos 37% em percentagem do peso seco, e de concentração volumétrica de 1785 mg PHA/L.

Na avaliação da capacidade de tratamento do sistema, da análise à eficiência do reator, conclui-se que este sistema não teve a melhor eficácia no que diz respeito à remoção de carbono, azoto e carga orgânica. No entanto, esse tratamento foi limitado quer pela variabilidade da composição da alimentação, quer por ocorrências anómalas que provocaram situações de baixa sedimentabilidade, da qual este processo de tratamento num SBR depende fortemente. Ainda assim, a remoção da carga orgânica do efluente simulado foi bastante razoável, com um número elevado de amostras de sobrenadante com eficiências de remoção acima dos 90%. A ACP efetuada comprovou de certo modo a adequabilidade do sistema utilizado para a remoção da carga orgânica, pois a partir dessa análise pode-se aferir que uma maior capacidade de tratamento, e consequente maior captação pelos microrganismos de nutrientes do afluente, resulta numa maior capacidade de produção de PHA.

Em relação ao licor misto deste sistema de tratamento, pode-se concluir que a quase totalidade dos sólidos suspensos totais são voláteis e que uma grande parte desses sólidos suspensos é constituída por matéria orgânica oxidável, dada as boas correlações entre variáveis.

No entanto, o principal objetivo deste trabalho era comprovar a capacidade e potencial de uma metodologia de análise de imagem, através da aquisição de imagens em microscopia de fluorescência com *Nile Blue*, prever a concentração de PHA, usando modelos baseados na análise PLS e comparando-os com as concentrações experimentais de PHA, determinadas a partir de técnicas cromatográficas. Foram encontradas algumas limitações nesta metodologia ao nível da transformação da bidimensionalidade da área projetada dos grânulos de PHA nas imagens para a

sua tridimensionalidade real, na gama de concentração de PHA na qual a metodologia é válida e na amostragem relativamente curta. Porém, comprovou-se a potencialidade deste método obtendo-se um R^2 de 0,80 para o modelo de previsão da concentração mássica de PHA e de 0,71 para a concentração volumétrica. Pode-se assim concluir que esta é uma metodologia promissora para quantificar PHA em amostras de licor misto.

Adicionalmente, e usando outra técnica de análise multivariável, a MLRA, a partir dos resultados da ACP e com o *input* de um menor número de variáveis relativamente à análise com PLS, foi novamente comprovado que a análise de imagem poderá ser uma técnica relevante na quantificação do PHA e que poderá ser utilizada no controlo de um eventual sistema de tratamento de águas residuais com a produção deste biopolímero.

5.1. Sugestões para trabalhos futuros

Neste trabalho, uma das contrariedades ocorridas foram as variações das características químicas da alimentação, tais como a carência química de oxigénio e a concentração em carbono total e azoto total. Estas variações foram decisivas na forma de cálculo das eficiências de remoção destes parâmetros, dificultando a análise à eficiência do sistema. Para evitar estas dificuldades, sugere-se que se tome precauções com vista à não degradação dos reagentes utilizados, como adquirir recipientes de menor quantidade, não deixando que o tempo de utilização de um dado reagente se prolongue no tempo ou secar os reagentes antes da sua utilização, particularmente os higroscópicos, diminuindo a percentagem de humidade, mas tendo em conta a sua temperatura de degradação térmica.

As variações referidas anteriormente também poderão ter sido, em muito menor escala, provocadas pelo impacto da degradação ao longo do tempo da alimentação preparada para introduzir no reator. Seria conveniente estudar os efeitos dessa degradação em termos de CQO, concentração de TN e de TC, com o intuito de verificar se a composição química se altera significativamente.

Apesar do razoável número de análises efetuadas neste trabalho e da sua elevada laboriosidade, seria interessante determinar concentrações de nitritos, nitratos e amónio (em vez do azoto total) no sobrenadante bem como determinar em todas as amostras do mesmo a concentração de sólidos suspensos voláteis com o objetivo de comparar essas concentrações com os valores limite de emissão legalmente exigidos.

Outra determinação que seria interessante efetuar seria a da evolução da concentração de acetato ao longo do ciclo, nomeadamente na fase de arejamento. Através do conhecimento desses perfis de concentração para o sistema em causa, poder-se-ia escolher um intervalo de tempo mais adequado para a recolha das amostras tendo por base a identificação do tempo de esgotamento da fonte de carbono e assim melhorar a adequação do regime da alimentação dinâmica aeróbia (regime *feast / famine*).

Em relação à metodologia de previsão da concentração de PHA, as técnicas de análise estatística multivariável utilizadas necessitam quase sempre de um elevado número de amostras para

a sua validação. Assim, sugere-se que se altere a amostragem seja i) pela recolha de um maior número de amostras durante o ciclo de tratamento, sem descurar que a concentração de PHA dessas amostras deva ser variável ao longo do tempo de ciclo, ii) pelo aumento do número de ciclos por dia. O objetivo é aumentar o número de amostras e, consequentemente, aumentar o número de valores utilizados nas análises estatísticas, num tempo de operação mais curto.

Por outro lado, no sentido de aumentar a variância dos principais parâmetros que caracterizam o funcionamento do SBR, o que poderia ser relevante para estudos estatísticos que se baseiam nessa variabilidade, nomeadamente a ACP e o PLS, seria interessante estudar a resposta do sistema perante variações do caudal ou da composição da alimentação e nas características do reator, como o tempo de retenção hidráulico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, M. G. E., M. Eiroa, C. Torres, B. R. Nunes e M. Reis (2007). "Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses." *Journal of Biotechnology* (Elsevier Science Ltd.) 130: 411-421.
- Amaral, A. L., D. P. Mesquita e E. C. Ferreira (2013). "Automatic identification of activated sludge disturbances and assessment of operational parameters." *Chemosphere* 91: 705-710.
- Anderson, A. J. e E. A. Dawes (1990). "Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates." *Microbiological Reviews* (American Society for Microbiology) 54: 450-472.
- APHA, AWWA e WEF (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20^a ed. E.U.A.: American Public Health Association.
- Baptist, J. N. e J. B. Ziegler (1965). "Method of making absorbable surgical sutures from poly beta hydroxy acids." *Patent US3225766 (A)*, W. R. Grace & Co. E.U.A.
- Bengtsson, S. (2009). "The Utilization of Glycogen Accumulating Organisms for Mixed Culture Production of Polyhydroxyalkanoates." *Biotechnology and Bioengineering* (Wiley Periodicals, In) 104: 698-708.
- Bohmert-Tatarev, K., S. McAvoy, S. Daughtry, O. P. Peoples e K. D. Snell (2011). "High levels of bioplastic are produced in fertile transplastomic tobacco plants engineered with a synthetic operon for the production of polyhydroxybutyrate." *Plant Physiology* 155: 1690-1708.
- Borges, V. S. R. (2010). "Controlo microbiológico de culturas mistas para a produção de PHA." Tese de Mestrado, Departamento de Ambiente e Ordenamento, Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Brandl, H., R. A. Gross, R. W. Lenz e R. C. Fuller (1990). "Plastic from bacteria and for bacteria: Poly((-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters." *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 41: 77-93.
- Byrom, D. (1994). "Polyhydroxyalkanoates." In *Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors*, de Y. Doi, montagem por D. P. Mobley, 5-33. Munich.
- Carvalho, G., P. C. Lemos, A. Oehmen e M. A. M. Reis (2007). "Denitrifying phosphorus removal: Linking the process performance with the microbial community structure." *Water Research* (Elsevier Ltd.) 41: 4383-4396.
- Changli, L., Z. Min, G. Jianhui, L. Chenchen, D. Yang e X. Wenhui (2010). "Concentration of Organic Matter Effect on Activated Sludge PHB Accumulation." *International Conference on Biology, Environment and Chemistry* (IACSIT Press) 1: 57-59.

- Chen, G. (2010). "Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates." In *Plastics from bacteria: natural functions and applications*, de G. Chen, 17-37. Berlin: Heidelberg: Springer-Verlag.
- Chua, A. S. M., H. Takabatake, H. Satoh e T. Mino (2003). "Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent." *Water Research* (Elsevier Science Ltd.) 37: 3602-3611.
- Chua, H. e P. H. F. Yu (1999). "Production of biodegradable plastics from chemical wastewater — A novel method to reduce excess activated sludge generated from industrial wastewater treatment." *Water Science and Technology* (Elsevier Science Ltd.) 39: 273-280.
- Coats, E. R., F. J. Loge, W. Smith, D. N. Thompson e M. Wolcott (2007). "Functional Stability of a Mixed Microbial Consortium Producing PHA From Waste Carbon Sources." *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Humana Press Inc.) 136-140: 909-926.
- Coats, E. R., K. E. VandeVoort, J. Darby e F. J. Loge (2011). "Toward Polyhydroxyalkanoate Production Concurrent with Municipal Wastewater Treatment in a Sequencing Batch Reactor System." *Journal of Environmental Engineering* (ASCE) 137: 46-54.
- Cox, M. K. (1995). "Recycling biopol – composting and material recycling." *Journal of Macromolecular Science: Pure and Applied Chemistry* A32: 607-612.
- Da Motta, M., M. N. Pons e N. Roche (2001). "Automated monitoring of activated sludge in a pilot plant using image analysis." *Water Sci Technol* 43: 91-96.
- Davis, M. (2010). *Water and Wastewater Engineering*. 1ª. EUA: McGraw-Hill Companies, Inc.
- De Koning, D. (1995). "Physical properties of bacterial poly((R)-3-hydroxyalkanoates)." *Canadian Journal of Microbiology* 41: 303-309.
- Dias, J. M. L. (2008). "Metabolic modelling and optimization of polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures." Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- Dionisi, D., G. Carucci, M. P. Papini, C. Riccardi, M. Majone e F. Carrasco (2005). "Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers." *Water Research* 39: 2076-2084.
- Dionisi, D., M. Majone, V. Papa e M. Beccari (2004). "Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding." *Biotechnology and Bioengineering* (Wiley Periodicals, Inc.) 85: 569-579.
- Doi, Y. (1990). *Microbial polyesters*. New York: Verlag Chemie.
- Du, G. e J. Yu (2002). "Green Technology for Conversion of Food Scraps to Biodegradable Thermoplastic Polyhydroxyalkanoates." *Environmental Science Technology* (American Chemical Society) 36: 5511-5516.

- EPA (2013). "Total Nitrogen." Montagem por United States Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/region9/water/tribal/training/pdf/TotalNitrogen.pdf> (acedido em 2 de Janeiro de 2014).
- Friel, C. M. (2010). "Factor Analysis." <http://www.bama.ua.edu/>. The University of Alabama. <http://www.bama.ua.edu/~jcsenkbeil/gy523/Factor%20Analysis.pdf> (acedido em 22 de Agosto de 2013).
- Gerardi, M. H. (2002). *Settleability Problems and Loss of Solids in the Activated Sludge Process*. 1ª. EUA: John Wiley & Sons, Inc.
- Gerardi, M. H. (2010). *Troubleshooting the Sequencing Batch Reactor*. 1ª. EUA: John Wiley & Sons, Inc.
- Grage, K., A. C. Jahns, N. Parlene, R. Palanisamy, I. A. Rasiah, J. A. Atwood e B. H. A. Rehm (2009). "Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications." *Biomacromolecules* 10: 660-669.
- Gurieff, N. e P. Lant (2007). "Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production." *Bioresource Technology* (Elsevier Science Ltd.) 98: 3393-3403.
- Hempel, F., A. F. Bozarth, N. Lindenkamp, A. Klingl, S. Zauner, U. Linne, A. Steinbuchel e U. G. Maier (2011). "Microalgae as bioreactors for bioplastic production." *Microbial Cell Factories* 10: 81-86.
- Holmes, P. A. (1985). "Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic." *Physics in Technology* 16: 32-36.
- Jendrossek, D., O. Selchow e M. Hoppert (2007). "PHB granules at the early stages of formation are localized clor to the cytoplasmic membrane in *Caryophanon latum*." *Applied and Environmental Microbiology* 73: 586-593.
- Jenné, R., E. N. Banadda, I. Smets, J. Deurinck e J. Van Impe (2007). "Detection of filamentous bulking problems: developing an image analysis system for sludge composition monitoring." *Microsc Microanal* 13(1): 36-41.
- Jiang, Y. (2011). *Polyhydroxyalkanoates production by bacterial enrichments*. Tese de Mestrado, Wageningen University, Wageningen: Wageningen University.
- Johnson, K., Y. Jiang, R. Kleerebezem, G. Muyzer e M. C. M. van Loosdrecht (2009). "Enrichment of a Mixed Bacterial Culture with a High Polyhydroxyalkanoate Storage Capacity." *Biomacromolecules* (American Chemical Society) 10: 670-676.
- Kessler, B. e B. Witholt (1998). "Synthesis, recovery and possible application of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: a short overview." *Macromolecular Symposium* 130: 245-260.
- Krishna, C. e M. C. M. Van Loodsdrecht (1999). "Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge." *Wat. Res.* (Elsevier Science Ltd.) 33: 2374-2382.

- Lawrence, A. G., J. H. Choi, C. K. Rha, J. Stubbe e A. J. Sinskey (2005). "In vitro analysis of the chain termination reaction in the synthesis of poly-(R)-beta-hydroxybutyrate by the class III synthase from *Allochromatium vinosum*." *Biomacromolecules* 6: 2113-2119.
- Laycock, B., P. Halley, S. Pratt, A. Werker e P. Lant (2013). "The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates." *Prog Polym Sci* (Elsevier Science Ltd.) 38: 536–583.
- Lee, S. Y. (1996). "Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria." *Trends in Biotechnology* (Elsevier Ltd.) 11: 431-438.
- Lemos, P. C., L. S. Serafim e M. A. M. Reis (2006). "Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding." *Journal of Biotechnology* (Elsevier Science Ltd.) 122: 226-238.
- Luzier, W. D. (1992). "Materials derived from biomass biodegradable materials." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 839-842.
- Majone, M., R. Ramadori e M. Beccari (1999). "Biodegradable polymers from wastes by using activated sludges enriched by aerobic periodic feeding." *AIDIC Conf Ser* 4: 163-170.
- Mayer, F. e M. Hoppert (1997). "Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer." *Journal of Basic Microbiology* 37: 45-52.
- McCool, G. J., T. Fernandez, N. Li e M. C. Cannon (1996). "Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*." *FEMS Microbiology Letters* (138): 41-48.
- Meeters, K (1998). *Production of poly-3-hydroxyalkanoates from waste streams. Design Report*. Delft University of Technology, Delft: Delft University of Technology.
- Mesquita, D. P., C. Leal, J. R. Cunha, A. L. Amaral, M. A. M. Reis, E. C. Ferreira e A. Oehmen (2013). "Prediction of intracellular storage polymers using quantitative image analysis in enhanced biological phosphorus removal systems." *Analytica Chimica Acta* (Elsevier Science Ltd.) 770: 36-44.
- Neumann, L., F. Spinozzi, R. Sinibaldi, F. Rustichelli, M. Potter e A. Steinbuchel (2001). "Binding of the major phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to poly(3-hydroxybutyrate) granules." *Journal of Bacteriology* 190: 2911-2919.
- Noda, I., P. R. Green, M. M. Satkowski e L. A. Schechtman (2005). "Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers." *Biomacromolecules* 6: 580-586.
- Nuti, M. P., M. Bertoldi e A. A. Lepidi (1972). "Influence of phenylacetic acid on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) polymerization and cell elongation in *Azotobacter chroococcum* Beij." *Canadian Journal of Microbiology* 18: 1257-1261.
- Oehmen, A., B. Keller-Lehmann, R. J. Zeng, Z. Yuan e J. Keller (2005b). "Optimisation of poly-beta-hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems." *Journal of Chromatography A* (Elsevier B.V.) 1070: 131-136.

- Oehmen, A., P. C. Lemos, G. Carvalho, Z. Yuan, J. Keller, L. L. Blackall e M. A. M. Reis (2007). "Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale." *Water Research* 41: 2271-2300.
- Oehmen, A., F. V. Pinto, V. Silva, M. G. E. Albuquerque e M. A. M. Reis (2014). "The impact of pH control on the volumetric productivity of mixed culture PHA production from fermented molasses." *Eng. Life Sci.* 14: 143-152.
- Oehmen, A., Z. Yuan, L. Blackall e J. Keller (2005a). "Comparison of Acetate and Propionate Uptake by Polyphosphate Accumulating Organisms and Glycogen Accumulating Organisms." *Biotechnology and bioengineering* 91: 162-168.
- Ostle, A. G. e J. G. Holt (1982). "Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-Beta-Hydroxybutyrate." *Applied and Environmental Microbiology* 44: 238-241.
- Poirier, Y., D. E. Dennis, K. Klomparens e C. Somerville (1992). "Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants." *Science* 256: 520-523.
- PolyOne (2008). "PHBV-Based Biopolymer Compounds - Case Study." <http://www.polyone.com/en-us/docs/Documents/PHBV-Based%20Biopolymer%20-%20Consumer%20Case%20Study.pdf> (acedido em 19 de Março de 2013).
- Potter, M. e A. Steinbuchel (2005). "Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation." *Biomacromolecules* 6: 552-560.
- Potter, M., M. H. Madkour, F. Mayer e A. Steinbuchel (2002). "Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16." *Microbiology-Sgm* 148: 2413-2426.
- Punrattanasin, W. (2001) *The Utilization of Activated Sludge Polyhydroxyalkanoates for the Production of Biodegradable Plastics*. Tese de Doutorado, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, E. U. A.: Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Qu, B. e J. Liu (2009). "Determination of optimum operating conditions for production of polyhydroxybutyrate by activated sludge submitted to dynamic feeding regime." *Chinese Science Bulletin* (Springer) 54: 142-149.
- Reis, M. A. M., L. S. Serafim, P. C. Lemos e A. M. Ramos (2003). "Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures." *Bioprocess Biosyst Eng* 25: 377-385.
- Ryu, H. W., S. K. Hahn, Y. K. Chang e H. N. Chang (1997). "Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation." *Biotechnology and Bioengineering* (John Wiley & Sons, Inc.) 55: 28-32.
- Satoh, H., Y. Iwamoto, T. Mino e T. Matsuo (1998). "Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic." *Water Science and Technology* (Elsevier Ltd.) 38: 103-109.

- Serafim, L. S., P. C. Lemos, R. Oliveira e M. A. M. Reis (2004). "Optimization of Polyhydroxybutyrate Production by Mixed Cultures Submitted to Aerobic Dynamic Feeding Conditions." *Biotechnology and Bioengineering* (Wiley Periodicals, Inc.) 87.
- Shimadzu (2001). *PC-Controlled Total Organic Carbon Analyzer - TOC-VCPH/CPN & TOC-Control V Software, User Manual*. Manual de utilizador, Process & Environmental Instrumentation Division, Japão: Shimadzu Corporation.
- Somleva, M. N., K. D. Snell, J. J. Beaulieu, O. P. Peoples, B. R. Garrison e N. A. Paterson (2008). "Production of polyhydroxybutyrate in switchgrass." *Plant Biotechnology Journal* 6: 663-678.
- Taguchi, S., H. Nakamura, T. Kichise, T. Tsuge, I. Yamato e Y. Doi (2003). "Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase." *Biochemical Engineering Journal* (Elsevier Science Ltd.) 16: 107-113.
- Takabatake, H., H. Satoh, T. Mino e T. Matsuo (2000). "Recovery of biodegradable plastics from activated sludge process." *Water Science and Technology* 42: 351-356.
- Tchobanoglous, G., F. L. Burton e H. D. Stensel (2003). *Wastewater Engineering - Treatment and Reuse*. 4ª. Montagem por Metcalf & Eddy Inc. McGraw Hill Companies, Inc.
- Tian, J. M., A. M. He, A. G. Lawrence, P. Liu, Watson, N. Watson, A. J. Sinskey e J. Stubbe (2005). "Analysis of transient polyhydroxybutyrate production in *Wautersia eutropha* H16 by quantitative western analysis and transmission electron microscopy." *Journal of Bacteriology* 187: 3825-3832.
- Veira, M. M. C (2005). *Estudo da cinética de acumulação e consumo de polímeros de reserva num reactor de biofilmes para a remoção do azoto*. Tese de Mestrado, Universidade do Minho.
- Wang, F. e S. Y. Lee (1997). "Production of poly (3-hydroxybutyrate) by fedbatch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology* (American Society for Microbiology) 63: 4765-4769.
- Wieczorek, R., A. Pries, A. Steinbuchel e F. Mayer (1995). "Analysis of a 24-Kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes-Eutrophus*." *Journal of Bacteriology* 177: 2425-2435.
- Yamane, T., M. Fukunaga e Y. W. Lee (1996). "Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer." *Biotechnology and Bioengineering* (John Wiley & Sons, Inc.) 50: 197-202.
- York, G. M., J. Stubbe e A. J. Sinskey (2001). "New insight into the role of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxybutyrate." *Journal of Bacteriology* 183: 2394-2397.

7. ANEXOS

A. Procedimento da determinação da carência química de oxigénio

O seguinte procedimento foi adaptado de *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, secção 5220 D (APHA et al., 1999).

Material

- ✓ Tubos de digestão em borossilicato 16 mm x 100 mm com rolhas rosçadas;
- ✓ Bloco de aquecimento, com 10,5 e 10,9 cm de altura, com aberturas de tamanho suficiente para se ajustarem aos tubos de digestão, capaz de operar a $150^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- ✓ Espectrofotómetro (modelo *Spectronic 301*, Milton Roy, E.U.A.) para uso na região dos 420 e 600 nm.

Reagentes

Solução de digestão de dicromato de potássio 0,01667 M:

- ✓ Adicionar a aproximadamente 500 mL de água destilada, 10,216 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, reagente de grau 1, previamente seco a 150°C durante 2 h, 167 mL de H_2SO_4 concentrado (95%) e 33,3 g de HgSO_4 .
- ✓ Dissolver, deixar arrefecer até à temperatura ambiente.
- ✓ Diluir a 1000 mL com água destilada.

Solução de ácido sulfúrico:

- ✓ Adicionar Ag_2SO_4 puro a ácido sulfúrico concentrado (95%), na proporção de 5,5 g de Ag_2SO_4 por kg de H_2SO_4 .
- ✓ Deixar em repouso 1 ou 2 dias para dissolver o Ag_2SO_4 . Misturar.

Solução padrão de hidrogenoftalato de potássio (KHP). O KHP tem uma CQO teórica de 1,176 mg O_2 /mg KHP pelo que esta solução apresenta uma CQO de 500 mg/L:

- ✓ Triturar lentamente e depois secar a 110°C até peso constante o hidrogenoftalato de potássio ($\text{HOOC}_6\text{H}_4\text{COOK}$).
- ✓ Dissolver e diluir 425 mg em 1000 mL de água destilada.

Procedimento

Preparação da curva de calibração:

- ✓ Preparar pelo menos 5 padrões da solução de hidrogenoftalato de potássio (KHP) com CQO cobrindo toda a amplitude de concentrações. Neste caso prepararam-se 12 soluções padrão cobrindo a gama dos 0 mg O_2 /L até aos 1000 mg O_2 /L.
- ✓ Perfazer os volumes com água destilada.
- ✓ Usar os mesmos volume de reagentes, de tubos e de procedimento de digestão que os das amostras.

Tratamento das amostras:

- ✓ Lavar os tubos de digestão e as rolhas com H_2SO_4 a 20 % (solução aquosa) antes de serem usados pela 1ª vez para evitar a contaminação.
- ✓ Colocar 2,5 mL de amostra no tubo e adicionar 1,5 mL de solução de digestão.
- ✓ Adicionar cuidadosamente 3,5 mL de solução de ácido sulfúrico.
- ✓ Rolhar os tubos e agitar até homogeneização completa da mistura. Usar uma proteção para o rosto e proteger as mãos do calor produzido enquanto agitar o conteúdo dos tubos.
- ✓ Colocar os tubos no bloco de aquecimento pré-aquecido a 150 °C e deixar digerir durante 2 h.
- ✓ Arrefecer à temperatura ambiente vagarosamente (para evitar formação de precipitado) e colocar os tubos no suporte.

Medição da redução do dicromato:

- ✓ Caso necessário ventilar as amostras para aliviar as amostras da pressão formada na digestão.
- ✓ Misturar o conteúdo dos tubos para juntar a água condensada e desalojar a matéria insolúvel.
- ✓ Deixar essa matéria assentar e ter a certeza que o caminho ótico está livre.
- ✓ A 600 nm, usar um branco digerido como padrão. Subtrair o valor de CQO desse branco à CQO da amostra.

B. Preparação das soluções padrão para o traçado da curva de calibração do método de determinação da concentração de PHA

Preparar uma solução mãe de PHB/PHV (copolímero P(3-HB,3-HV), *Sigma-Aldrich*, E.U.A.) de 500 mg/L em 250 mL de solução de padrão interno. Poderá haver dificuldades em dissolver o copolímero, que se encontra numa forma plástica, pelo que será necessária a sua dissolução num agitador orbital durante algumas horas. Colocar um volume apropriado dessa solução de PHB/PHV para frascos de digestão 10 mL. Os padrões devem estar na gama de 0,5 mg a 2,5 mg de polímero (com intervalos de $\approx 0,50$ mg). Introduzir também 1 mL de padrão interno em todos os padrões para assegurar uma concentração semelhante em todas as amostras. Perfazer até aos 6 mL de solução com diclorometano.

Efetuar o passo de digestão e extração juntamente com as amostras.

C. Reagentes utilizados no trabalho experimental

Tabela 7.1. Dados dos reagentes utilizados consoante o seu objetivo.

Utilização do reagente	Nome	Fórmula química	Grau de pureza mínimo	Laboratório	CAS	Referência	Lote
Alimentação	Acetato de sódio tri-hidratado	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	100,00%	VWR BDH Prolabo	6131-90-4	0530-1KG	11C160007
	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	99,50%	Merck	10034-99-8	1.05886.0500	A0300586 121
	Cloreto de amónio	NH_4Cl	99,00%	Himedia	12125-02-9	RM730-500G	0000068470
	Ácido etilenodiamino tetra-acético di-hidratado, EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	99,50%	Himedia	6381-92-6	RM1370-500G	0000096471
	Hidrogenofosfato de di-potássio anidro	K_2HPO_4	99,00%	Panreac	7758-11-4	121512.1210	0000288471
	Di-hidrogenofosfato de potássio	KH_2PO_4	99,50%	Merck	7778-77-0	1.04873.0250	A0185473 113
	Cloreto de cálcio di-hidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	99,00%	Panreac	10035-04-8	131232.1210	0000303057
	Thiourea	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$	99,00%	VWR BDH Prolabo	62-56-6	28615.231	11C110007
Solução de micro-nutrientes	Cloreto de ferro (III) hexa-hidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	*	Panreac	10025-77-1	231358.1210G	0000253076
	Ácido bórico	H_3BO_3	99,50%	Pronalab	10043-35-3	402764	9D002039I
	Cloreto de cobalto (II) hexa-hidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	98,00%	Panreac	7791-13-1	141257.1209	0000280642
	Cloreto de manganês (II) tetra-hidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100,07%	VWR BDH Prolabo	13446-34-9	25222.233	11E040036
	Sulfato de zinco hepta-hidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	99,50%	VWR BDH Prolabo	7446-20-0	29253.236	11E170034
	Molibdato de sódio di-hidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	99,50%	Merck	10102-40-6	1.06521.0100	A0012621 010
	Sulfato de cobre (II) penta-hidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	99,00%	Panreac	7758-99-8	131270.1210	0000291286
	Iodeto de potássio	KI	99,50%	VWR BDH Prolabo	7681-11-0	26846.235	11D120020

Legenda: (*) Dados não disponíveis.

Tabela 7.1. Dados dos reagentes utilizados consoante o seu objetivo (continuação).

Utilização do reagente	Nome	Fórmula química	Grau de pureza mínimo	Laboratório	CAS	Referência	Lote
Determinação da CQO	Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	95,00%	<i>Fisher</i>	7664-93-9	S/9240/PB15 S/9240/PB17	1165184 e 1174598
	Sulfato de prata	Ag ₂ SO ₄	98,50%	<i>Carlo Erba</i>	10294-26-5	424203	5E637225G
	Sulfato de prata	Ag ₂ SO ₄	99,00%	<i>Fisher</i>	10294-26-5	S/1400/46	1144523
	Dicromato de potássio	K ₂ Cr ₂ O ₇	99,90%	<i>Merck</i>	53-22-28	1.4864.1000	K15431764
	Sulfato de mercúrio (II)	HgSO ₄	99,00%	<i>Riedel-de Haen</i>	7783-35-9	31013	93100
	Hidrogenoftalato de potássio	HOOC C ₆ H ₄ COOK	99,90%	<i>Merck</i>	877-24-7	1.04874.0250	K12789674
Fixação de amostras de licor misto	Cloreto de sódio	NaCl	99,50%	<i>Panreac</i>	7647-14-5	131659.1211	0000285578
	Cloreto de potássio	KCl	99,50%	<i>Panreac</i>	7447-40-7	131494.1211	482800AT
	Hidrogenofosfato de di-sódio dodeca-hidratado	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	99,00%	<i>Merck</i>	10039-32-4	1.06579.0500	A763079
	Di-hidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	O mesmo recipiente utilizado para a alimentação.				
	Formaldeído	CH ₂ O	35,80%	<i>VWR BDH Prolabo</i>	50-00-0	20909.290	10L300521
	Etanol	C ₂ H ₆ O	96,00%	*	*	*	13000123
Coloração Nile Blue	<i>Nile Blue</i>	*	*	*	*	*	*
	Ácido acético	CH ₃ CO ₂ H	99,80%	<i>VWR BDH Prolabo</i>	64-19-7	20104.334	11D080523
	Cloreto de sódio	NaCl	O mesmo recipiente utilizado na fixação de amostras de licor misto.				
Determinação da concentração de PHA por GC-FID	Formaldeído	CH ₂ O	O mesmo recipiente utilizado na fixação de amostras de licor misto.				
	Ácido benzóico	C ₇ H ₆ O ₂	99,70%	<i>VWR BDH Prolabo</i>	65-85-0	20172.180	11E240009
	Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	99,80%	<i>VWR BDH Prolabo</i>	75-09-2	23354.326	10J150514
	Ácido clorídrico	HCl	36,10%	<i>VWR BDH Prolabo</i>	7647-01-0	20252.335	11B080511
	Propanol-1	H ₃ CCH ₂ CH ₂ OH	99,90%	<i>VWR BDH Prolabo</i>	71-23-8	20861.320	10I100500
	Sulfato de sódio anidro	Na ₂ SO ₄	99,00%	<i>Panreac</i>	7757-82-6	131716.1211	0000321195
	PHBV, PHV 12 mol %	C ₉ H ₁₈ O ₆	100,00%	<i>Sigma-Aldrich</i>	80181-31-3	403121-10G	MKBH6399V

Legenda: (*) Dados não disponíveis.